



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIANECIAS BIOLÓGICAS**

**Efecto de la interacción nanotubos de carbono glicina-betaína y
ferritas de magnesio sobre el sistema antioxidante de semillas de *Zea
mays* como respuesta al estrés hídrico**

TESIS

para obtener el título de

Maestro en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A

Nicolás Abraham Zamudio Durán.

DIRECTOR DE TESIS

Dr. H. Javier A. Villegas Moreno.

CO DIRECTOR DE TESIS

Dr. Salomón Eduardo Borjas García.

Morelia, Michoacán, marzo, 2024

El presente trabajo de investigación plasmado en esta tesis se llevó a cabo durante el periodo Septiembre (2022)- Febrero (2024) en el laboratorio de Interacción Suelo Planta Microorganismo del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Fue financiado por la Coordinación de Investigación Científica (CIC), con el apoyo del El Colegio de Michoacán/LADIPA y la beca otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT).



Agradecimientos

Agradezco a Dios por enseñarme a poner paso firme en la fe y confiar plenamente en Él.

A mi director de tesis, Dr. H. A. Javier Villegas Moreno por poner en mi la emoción de descubrir nuevos aspectos de la vida, por su grata colaboración, sus enseñanzas y guía brindada para la culminación de este trabajo.

A mi valioso comité sinodal, Dra. Mariela Gómez, Dra Gladys Juárez, Dr. Salomón Borjas Dr. Luis López, quienes me brindaron todo el entusiasmo, tiempo, apoyo y el conocimiento, en cada una de las etapas del desarrollo de mi investigación. Por siempre recibirme con una agradable sonrisa y un excelente trato a mi persona.

A mis amigos Marco Antonio, Daniela y Neftalí, siempre estuvieron ahí en el momento exacto.

Con toda mi admiración y respeto, Dra. Gladys Juárez Cisneros por toda tu dedicación, la forma de resolver mi impaciencia, por enseñarme lo que es correcto y como hacerlo, gracias a usted esto es posible.

De manera muy especial al Q.F.B Néstor Alejandro Muñoz Ruiz por compartir conmigo tu amistad.

A mis estimados directores de la Preparatoria “Ing. Pascual Ortiz Rubio” Dra. Tania Bucio, M.C. Araceli Méndez, Dr. Carlos Alfredo Rosales, gracias por la oportunidad y las atenciones que me han brindado.

Todo mi agradecimiento a mi familia y a mis padres, por llenarme de ánimo y valor para afrontar las adversidades de la vida.

Dedicatoria

A mis hijos, Sofia Nicole y Abraham son el motor y la razón verdadera de mi esfuerzo, los amo pequeños, por compartir días de trabajo conmigo y transmitir su aliento desde su inocencia.

A mi esposa Rosalía, gracias por caminar junto a mí en esta etapa de la vida, por tus abrazos y tus consejos, por escucharme y entenderme aunque no tuviera la razón, por alentarme en todas mis desveladas, por todos los momentos juntos, todo esto es para ustedes. Doy gracias a Dios por tu vida y por compartirla a mi lado, te amo siempre.

Índice

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	3
1.1. Nanobiología	3
1.2. Nanobiotecnología	3
1.3. Clasificación de las Nanopartículas	4
1.4. Nanopartículas de origen natural	5
1.5. Nanopartículas de carbono cristalino (grafeno).....	6
1.6. Clasificación de las NPs de acuerdo con su morfología	6
1.7. Clasificación de las NPs de acuerdo con morfología	7
1.8. Clasificación de las NPs de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas	8
1.8.1. Nanopartículas orgánicas a base de grafeno	9
1.8.1.1. Nanotubos de carbono	9
1.8.2. Nanopartículas Inorgánicas a base de oxido ferroso	11
1.8.2.1. Nanopartícula de Ferrita de magnesio.....	11
1.9. La Nanoagricultura	12
1.10. Efecto de los MWCNTs sobre las plantas	13
1.11. Efecto de las nanopartículas metálicas sobre las plantas.....	15
1.12. El magnesio en las plantas	17
1.13. Las plantas y su respuesta al estrés	18
1.14. Las nanopartículas y el estrés hídrico vegetal	18
1.15. Papel de la glicina-betaína en el déficit hídrico vegetal	19
1.16. Maíz.....	20
1.17. El maíz y estrés hídrico	21

1.18.	Anatomía de semilla del maíz y factores que regulan la germinación	22
1.18.1.	Clasificación Taxonómica.....	22
1.18.2.	Estructura del grano de maíz	22
2.	JUSTIFICACIÓN	24
3.	HIPÓTESIS.....	24
4.	OBJETIVOS.....	25
4.1.	Objetivo General	25
4.2.	Objetivos Particulares.....	25
5.	MATERIAL Y MÉTODOS	25
5.1.	Obtención de las nanopartículas	25
5.1.1.	Nanotubos de carbono de pared múltiple	25
5.1.2.	Ferrita de Magnesio ($MgFe_2O_4$)	26
5.1.3.	Glicina-Betaína	27
5.2.	Establecimiento de Bioensayos <i>in vitro</i> de <i>Zea mays</i> cultivado con NPs y/o glicina betaína en condiciones de estrés hídrico	27
5.2.1.	Fase I	27
5.2.1.1.	Localización histoquímica de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	28
5.2.1.1.1.	Actividad deshidrogenasa de las semillas.....	28
5.2.1.1.2.	Detección del anión superóxido (O_2^-) en semilla	29
5.2.1.1.3.	Determinación de H_2O_2 en semilla	29
5.2.2.	Fase II	29
5.3.	Variables respuesta	31
6.	DISEÑO EXPERIMENTAL	31
6.1.	Análisis estadístico	32

7. RESULTADOS.....	34
7.1. FASE I.....	37
7.1.1. Evaluación de los efectos de los MWCNT y la interacción MWCNT/G-B sobre la semilla de maíz en condiciones de déficit hídrico	37
7.1.1.1. Germinación de semilla de maíz con MWCNT o la interacción MWCNT/Glicina-betaína en condiciones de déficit hídrico	37
7.1.1.2. Biomasa de semillas de maíz suplementadas con MWCNT con y sin interacción con glicina betaína	43
7.1.1.3. Determinación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en semillas de maíz suplementadas con MWCNT o MWCNT/G-B en condiciones de estrés hídrico.....	44
7.1.1.4. Determinación de deshidrogenasas en semillas de maíz suplementadas con MWCNT o la interacción MWCNT/G-B en condiciones de déficit hídrico.....	46
7.1.1.1. Cuantificación histoquímica de superóxidos (O₂⁻) en semillas de maíz suplementadas con MWCNT o la sinergia MWCNT/G-B en condiciones de estrés hídrico.....	48
7.1.2. Evaluación de los efectos de las nanopartículas de MgFe₂O₄ y la interacción MgFe₂O₄/G-B sobre las semillas de maíz en condiciones de déficit hídrico.	50
7.1.2.1. Germinación de semilla de maíz suplementado con MgFe₂O₄ o la interacción MgFe₂O₄/G-B en condiciones de déficit hídrico.	50
7.1.2.2. Biomasa de semillas de maíz suplementadas con nanopartículas de MgFe₂O₄ o la interacción MgFe₂O₄/G-B en condiciones de déficit hídrico.....	56
7.1.2.3. Determinación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de en semillas de maíz suplementadas con MgFe₂O₄ o MgFe₂O₄-GB en condiciones de déficit hídrico.....	57
7.1.2.4. Determinación de deshidrogenasas en semillas de maíz suplementadas con MgFe₂O₄ o la interacción MgFe₂O₄/G-B en condiciones de déficit hídrico	59
7.1.2.5. Cuantificación histoquímica de superóxidos (O₂⁻) en semillas de maíz suplementadas con MgFe₂O₄ o la interacción MgFe₂O₄/G-B en condiciones de déficit hídrico.....	61

7.2. Efecto de las NPs en interacción con glicina-betaína sobre el estadio temprano de desarrollo de maíz	63
7.2.1. Evaluación de los efectos de los MWCNT solos o en sinergia con glicina betaína sobre la germinación y emergencia temprana de la semilla de maíz	63
7.2.1.1. Porcentaje y velocidad de germinación de maíz suplementado con MWCNT o la interacción MWCNT /G-B	63
7.2.1.2. Biomasa de semillas de maíz suplementadas con MWCNT con y sin interacción con glicina betaína en condiciones de déficit hídrico	69
7.2.1.3. Determinación de peróxido de hidrógeno en semillas de maíz suplementadas con MWCNT con y sin interacción con glicina betaína en condiciones de déficit hídrico.....	70
7.2.1.4. Cuantificación de deshidrogenasas de la semilla de maíz con MWCNT	73
7.2.1.5. Cuantificación histoquímica de superóxidos (O_2^-) en semillas de maíz suplementadas con MWCNT o la sinergia MWCNT/G-B en condiciones de estrés hídrico.....	75
7.2.2. Evaluación de los efectos de las nanopartículas de $MgFe_2O_4$ y la interacción $MgFe_2O_4$ /G-B sobre las semillas de maíz en condiciones de déficit hídrico.	77
7.2.2.1. Supervivencia y velocidad de germinación con NPs ($MgFe_2O_4$, $MgFe_2O_4$ G-B)	77
7.2.2.2. Biomasa de semillas de maíz suplementadas con nanopartículas de $MgFe_2O_4$ o la interacción $MgFe_2O_4$ /G-B en condiciones de déficit hídrico.....	83
7.2.2.3. Determinación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de en semillas de maíz suplementadas con $MgFe_2O_4$ o $MgFe_2O_4$ -GB en condiciones de déficit hídrico.....	84
7.2.2.4. Determinación de deshidrogenasas en semillas de maíz suplementadas con $MgFe_2O_4$ o la interacción $MgFe_2O_4$ /G-B en condiciones de déficit hídrico	86
7.2.2.1. Cuantificación histoquímica de superóxidos (O_2^-) en semillas de maíz suplementadas con $MgFe_2O_4$ o $MgFe_2O_4$ /G-B.....	88
8. DISCUSIÓN	90
8.1. Nanomateriales de Carbono	90

8.2.	Nanomateriales de Ferrita de Magnesio.....	91
9.	<i>CONCLUSIONES</i>	93
10.	<i>REFERENCIAS</i>	94

Índice de tablas

TABLA 1. CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DE LAS NANOPARTÍCULAS	8
TABLA 2 TRATAMIENTOS PARA BIOENSAYOS CON MAÍZ EXPUESTAS A NPs DE MWCNT Y $MgFe_2O_4$ CON Y SIN INTERACCIÓN G-B EN CONDICIÓN DE ESTRÉS Y SIN ESTRÉS HÍDRICO	32
TABLA 3 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE MAÍZ SUPLEMENTADAS CON MWCNT EN INTERACCIÓN CON GLICINA-BETAÍNA CON Y SIN ESTRÉS HÍDRICO.....	42
TABLA 4 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE MAÍZ SUPLEMENTADAS CON FERRITAS DE MAGNESIO EN INTERACCIÓN CON GLICINA- BETAÍNA CON Y SIN ESTRÉS HÍDRICO.	55
TABLA 5 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE MAÍZ SUPLEMENTADO CON MWCNT EN INTERACCIÓN CON GLICINA BETAÍNA CON Y SIN ESTRÉS HÍDRICO.	68
TABLA 6 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE MAÍZ SUPLEMENTADAS CON FERRITAS DE MAGNESIO EN INTERACCIÓN CON GLICINA- BETAÍNA CON Y SIN ESTRÉS HÍDRICO.	82

Índice de Figuras

FIGURA 1 BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS	6
FIGURA 2 ESTRUCTURAS TÍPICAS DE NANOPARTÍCULAS DE CARBONO CRISTALINO Y METÁLICAS	7
FIGURA 3 FORMAS ALOTRÓPICAS DEL CARBONO CRISTALINO (SENGUPTA ET AL., 2015).....	10
FIGURA 4 IMAGEN GRÁFICA DE UNA ESTRUCTURA DEL GRAFENO, NANOTUBOS DE CARBONO Y DE UNA Y VARIAS CAPAS DE GRAFENO (GARCÍA & BETANCUR, 2012)	11
FIGURA 5 ESTRUCTURA DEL GRANO DE MAÍZ (HOSENEY, R.C. AND FAUBION, J.M. 1992.)	23
FIGURA 6 DIAGRAMA GENERAL	30
FIGURA 7 CARACTERIZACIÓN DE LOS MWCNT: A) ESPECTRO RAMAN Y B) MICROGRAFÍA OBTENIDA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.	34
FIGURA 8 MICROGRAFÍAS DE NANOPARTÍCULAS DE FERRITAS DE MAGNESIO DOPADAS CON MAGNESIO, OBTENIDAS POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	35
FIGURA 9 ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA Y TAMAÑO DE PORO DE NANOPARTÍCULAS DE FERRITAS DE MAGNESIO DOPADAS CON MAGNESIO. .	36
FIGURA 10 GERMINACIÓN DE MAÍZ CULTIVADO CON MWCNT EN CONCENTRACIONES DE 0, 5, 10 Y 20 ($\mu\text{g/mL}$) CON Y SIN GLICINA- BETAÍNA A LAS 42 H DESPUÉS DE LA SIEMBRA, PARA A) SIN ESTRÉS HÍDRICO Y B) BAJO ESTRÉS HÍDRICO.	38
FIGURA 11 GERMINACIÓN DE MAÍZ CULTIVADO CON MWCNT EN CONCENTRACIONES DE 0, 5, 10 Y 20 ($\mu\text{g/mL}$) Y SU INTERACCIÓN CON GLICINA-BETAÍNA EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO A LAS 54 H DESPUÉS DE LA SIEMBRA; A) SIN ESTRÉS HÍDRICO Y B) BAJO ESTRÉS HÍDRICO.	39
FIGURA 12 GERMINACIÓN DE MAÍZ CULTIVADO CON MWCNT EN CONCENTRACIONES DE 0, 5, 10 Y 20 ($\mu\text{g/mL}$) CON Y SIN GLICINA- BETAÍNA A LAS 68 H DESPUÉS DE LA SIEMBRA, PARA A) SIN ESTRÉS HÍDRICO Y B) BAJO ESTRÉS HÍDRICO.	40

FIGURA 13 BIOMASA DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ SUPLEMENTADAS CON 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ DE NANOTUBOS DE CARBONO CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS.....	43
FIGURA 14 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN SEMILLAS DE MAÍZ SUPLEMENTADOS CON 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ DE NANOTUBOS DE CARBONO CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS. A) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ TEÑIDAS CON (DAB) PARA DETECCIÓN DE H_2O_2 ; B) CUANTIFICACIÓN DE H_2O_2 EN SEMILLA DE MAÍZ SIN DÉFICIT HÍDRICO; C) CUANTIFICACIÓN DE H_2O_2 EN SEMILLA DE MAÍZ CON DÉFICIT HÍDRICO.....	45
FIGURA 15 DESHIDROGENASAS DE LA SEMILLA DE MAÍZ SUPLEMENTADAS CON 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ DE NANOTUBOS DE CARBONO CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS; A) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ TEÑIDAS CON TTC PARA EVALUAR INTENSIDAD DE DESHIDROGENASAS; B) DESHIDROGENASAS EN SEMILLA DE MAÍZ SIN DÉFICIT HÍDRICO; C) DESHIDROGENASAS EN SEMILLA DE MAÍZ CON DÉFICIT HÍDRICO.....	47
FIGURA 16 PRODUCCIÓN DE O_2^- EN SEMILLAS DE MAÍZ SUPLEMENTADOS CON 0, 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ DE NANOTUBOS DE CARBONO CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS. A) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ TEÑIDAS CON DAB; B) CUANTIFICACIÓN DE O_2^- EN SEMILLA DE MAÍZ SIN DÉFICIT HÍDRICO; C) CUANTIFICACIÓN DE O_2^- EN SEMILLA DE MAÍZ CON DÉFICIT HÍDRICO.	49
FIGURA 17 GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE MAÍZ CULTIVADA CON FERRITA DOPADA CON MAGNESIO SUPLEMENTADA CON 0, 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ CON Y SIN GLICINA-BETAÍNA A LAS 42 H DESPUÉS DE LA SIEMBRA; A) SIN ESTRÉS HÍDRICO Y B) EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO.	51
FIGURA 18 GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE MAÍZ CULTIVADA CON FERRITA DOPADA CON MAGNESIO SUPLEMENTADA CON 0, 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ CON Y SIN GLICINA-BETAÍNA A LAS 54 H DESPUÉS DE LA SIEMBRA; A) SIN ESTRÉS HÍDRICO Y B) EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO	52
FIGURA 19 GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE MAÍZ CULTIVADA CON FERRITA DOPADA CON MAGNESIO SUPLEMENTADA CON 0, 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ CON Y SIN GLICINA-BETAÍNA A LAS 68 H DESPUÉS DE LA SIEMBRA; A) SIN ESTRÉS HÍDRICO Y B) EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO	53
FIGURA 20 BIOMASA DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ SUPLEMENTADAS CON 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ DE NANOPARTÍCULAS DE MgFe_2O_4 CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS.....	56
FIGURA 21 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN SEMILLAS DE MAÍZ SUPLEMENTADOS CON 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ DE MgFe_2O_4 CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS. A) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ TEÑIDAS CON DAB PARA DETECCIÓN DE H_2O_2 ; B) CUANTIFICACIÓN DE H_2O_2 EN SEMILLA DE MAÍZ SIN DÉFICIT HÍDRICO; C) CUANTIFICACIÓN DE H_2O_2 EN SEMILLA DE MAÍZ CON DÉFICIT HÍDRICO.....	58
FIGURA 22 INTENSIDAD DE DESHIDROGENASAS DE LA SEMILLA DE MAÍZ SUPLEMENTADAS CON 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ DE MgFe_2O_4 CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS; A) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ TEÑIDAS CON TTC; B) INTENSIDAD DE DESHIDROGENASAS EN SEMILLA DE MAÍZ SIN DÉFICIT HÍDRICO; C) INTENSIDAD DE DESHIDROGENASAS EN SEMILLA DE MAÍZ CON DÉFICIT HÍDRICO.	60

FIGURA 23 PRODUCCIÓN DE O_2^- EN SEMILLAS DE MAÍZ SUPLEMENTADOS CON 0, 5, 10 Y 20 $\mu\text{g}/\text{ML}$ DE NANOTUBOS DE MgFe_2O_4 CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS. A) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ TEÑIDAS CON NBT; B) CUANTIFICACIÓN DE O_2^- EN SEMILLA DE MAÍZ SIN DÉFICIT HÍDRICO; C) CUANTIFICACIÓN DE O_2^- EN SEMILLA DE MAÍZ CON DÉFICIT HÍDRICO.	62
FIGURA 24 GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE MAÍZ CULTIVADA CON FERRITA DOPADA SUPLEMENTADA CON 0, 5, 10 Y 20 $\mu\text{g}/\text{ML}$ CON Y SIN GLICINA-BETAÍNA A LAS 42 H DESPUÉS DE LA SIEMBRA; A) SEMILLAS SIN EXPOSICIÓN A DÉFICIT HÍDRICO. B) SEMILLAS EXPUESTAS A DÉFICIT HÍDRICO.	64
FIGURA 25 GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE MAÍZ CON MWCNT EN CONCENTRACIONES DE 0, 5, 10 Y 20 $\mu\text{g}/\text{ML}$ CON Y SIN GLICINA-BETAÍNA A LAS 54 H DESPUÉS DE LA SIEMBRA. A) SEMILLAS SIN EXPOSICIÓN A DÉFICIT HÍDRICO. B) SEMILLAS EXPUESTAS A DÉFICIT HÍDRICO.	65
FIGURA 26 GERMINACIÓN DE SEMILLA DE MAÍZ CULTIVADA CON MWCNT EN CONCENTRACIONES DE 0, 5, 10 Y 20 $\mu\text{g}/\text{ML}$ CON Y SIN GLICINA-BETAÍNA A LAS 68 H DESPUÉS DE LA SIEMBRA A) SEMILLAS SIN EXPOSICIÓN A DÉFICIT HÍDRICO. B) SEMILLAS EXPUESTAS A DÉFICIT HÍDRICO.	66
FIGURA 27 BIOMASA DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ SUPLEMENTADAS CON 5, 10 Y 20 $\mu\text{g}/\text{ML}$ DE NANOTUBOS DE CARBONO CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS.	70
FIGURA 28 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN SEMILLAS DE MAÍZ SUPLEMENTADO CON 0, 5, 10 Y 20 $\mu\text{g}/\text{ML}$ DE NANOTUBOS DE CARBONO CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS. A) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ TEÑIDAS CON DAB PARA DETECCIÓN DE H_2O_2 ; B) CUANTIFICACIÓN DE H_2O_2 EN SEMILLA DE MAÍZ SIN DÉFICIT HÍDRICO; C) CUANTIFICACIÓN DE H_2O_2 EN SEMILLA DE MAÍZ CON DÉFICIT HÍDRICO.	72
FIGURA 29 DESHIDROGENASAS DE LA SEMILLA DE MAÍZ SUPLEMENTADAS CON 5, 10 Y 20 $\mu\text{g}/\text{ML}$ DE NANOTUBOS DE CARBONO CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS; A) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ TEÑIDAS CON TTC PARA EVALUAR INTENSIDAD DE DESHIDROGENASAS; B) DESHIDROGENASAS EN SEMILLA DE MAÍZ SIN DÉFICIT HÍDRICO; C) DESHIDROGENASAS EN SEMILLA DE MAÍZ CON DÉFICIT HÍDRICO.	74
FIGURA 30 INTENSIDAD DE O_2^- EN SEMILLA DE MAÍZ SUPLEMENTADA CON 0, 5, 10 Y 20 $\mu\text{g}/\text{ML}$ DE MWCNT CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS. A) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ TEÑIDAS CON (DAB) PARA DETECCIÓN DE O_2^- ; B) CUANTIFICACIÓN DE O_2^- EN SEMILLA DE MAÍZ SIN DÉFICIT HÍDRICO; C) CUANTIFICACIÓN DE O_2^- EN SEMILLA DE MAÍZ CON DÉFICIT HÍDRICO.	76
FIGURA 31 GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE MAÍZ CULTIVADA CON FERRITA DOPADA CON MAGNESIO SUPLEMENTADA CON 0, 5, 10 Y 20 $\mu\text{g}/\text{ML}$ CON Y SIN GLICINA-BETAÍNA A LAS 42 H DESPUÉS DE LA SIEMBRA; A) SIN ESTRÉS HÍDRICO Y B) EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO.	78
FIGURA 32 GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE MAÍZ CULTIVADA CON FERRITA DOPADA CON MAGNESIO SUPLEMENTADA CON 0, 5, 10 Y 20 $\mu\text{g}/\text{ML}$ CON Y SIN GLICINA-BETAÍNA A LAS 54 H DESPUÉS DE LA SIEMBRA; A) SIN ESTRÉS HÍDRICO Y B) EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO.	79

FIGURA 33 GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE MAÍZ CULTIVADA CON FERRITA DOPADA CON MAGNESIO SUPLEMENTADA CON 0, 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ CON Y SIN GLICINA-BETAÍNA A LAS 68 H DESPUÉS DE LA SIEMBRA; A) SIN ESTRÉS HÍDRICO Y B) EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO	80
FIGURA 34 BIOMASA DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ SUPLEMENTADAS CON 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ DE NANOPARTÍCULAS DE MgFe_2O_4 CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS.....	84
FIGURA 35 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN SEMILLAS DE MAÍZ SUPLEMENTADOS CON 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ DE MgFe_2O_4 CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS. A) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ TEÑIDAS CON DAB PARA DETECCIÓN DE H_2O_2 ; B) CUANTIFICACIÓN DE H_2O_2 EN SEMILLA DE MAÍZ SIN DÉFICIT HÍDRICO; C) CUANTIFICACIÓN DE H_2O_2 EN SEMILLA DE MAÍZ CON DÉFICIT HÍDRICO.....	85
FIGURA 36 INTENSIDAD DE DESHIDROGENASAS DE LA SEMILLA DE MAÍZ SUPLEMENTADAS CON 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ DE MgFe_2O_4 CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS; A) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ TEÑIDAS CON TTC PARA INTENSIDAD DE DESHIDROGENASAS; B) INTENSIDAD DE DESHIDROGENASAS EN SEMILLA DE MAÍZ SIN DÉFICIT HÍDRICO; C) INTENSIDAD DE DESHIDROGENASAS EN SEMILLA DE MAÍZ CON DÉFICIT HÍDRICO.....	87
FIGURA 37 PRODUCCIÓN DE O_2^- EN SEMILLAS DE MAÍZ SUPLEMENTADOS CON 0, 5, 10 Y 20 $\mu\text{G}/\text{ML}$ DE FERRITAS DOPADAS CON MAGNESIO CON Y SIN INTERACCIÓN GLICINA-BETAÍNA, BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO Y SIN ESTRÉS. A) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ TEÑIDAS CON DAB; B) CUANTIFICACIÓN DE O_2^- EN SEMILLA DE MAÍZ SIN DÉFICIT HÍDRICO; C) CUANTIFICACIÓN DE O_2^- EN SEMILLA DE MAÍZ CON DÉFICIT HÍDRICO.	89

ACRÓNIMOS

ACRÓNIMO	SIGNIFICADO
APX	Ascorbato peroxidasa
CAT	Catalasa
DAB	3,3-diaminobenzidine hydrochloride
Fe	Hierro
G-B	Glicina-Betaína
GR	Glutación reductasa
Mg	Magnesio
MgFe ₂ O ₄	Ferrita de Magnesio
MWCNT	Multi Walled-carbon nanotubes
NBT	nitroblu de tetrazolium
NPs	Nanopartículas
NTC	Nanotubo de carbono
POX	Peroxidasas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
SWCNT	Single Walled-carbon nanotubes
TTC	2,3,5-trifeniltetrazolio

RESUMEN

El impacto positivo de las nanopartículas (NPs) en el crecimiento y resistencia de las plantas, mitigando el estrés hídrico ha sido ampliamente estudiado. Los nanomateriales como los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) juegan un papel crucial en la nanoagricultura al estimular el crecimiento, acelerar la germinación y fortalecer la resistencia de las plantas ante diferentes tipos de estrés. Estos hallazgos subrayan el potencial de las NPs para mejorar la productividad agrícola y abordar desafíos ambientales. Recientemente se explora el uso de nanopartículas a base de metales como las ferritas, estas pueden ser dopadas con metales como el Mg, para beneficio de las plantas; sin embargo, aún no es claro el papel que estas pueden desempeñar en los sistemas vegetales. Además, se ha documentado el efecto positivo de sismas como glicina-betaína (G-B) para reducir el estrés hídrico en las plantas, sin embargo, la sinergia con nanopartículas orgánicas o metálicas no se ha documentado. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los MWCNT y la MgFe_2O_4 en sinergismo con glicina betaína, como alternativa para estimular la respuesta antioxidante en *Zea mays* cultivada en condiciones de estrés hídrico. Los resultados obtenidos con los MWCNT con y sin interacción G-B revelaron diferencias significativas durante la germinación de esta gramínea al aplicarlos desde la fase inicial (antes de la siembra), tanto al suplementarlos individualmente como combinadas con G-B, en los procesos de germinación bajo estrés. Por otro lado, las NPs de MgFe_2O_4 mostraron las nanopartículas individualmente o con G-B promovieron tasas de germinación más altas en comparación con las semillas control. Asimismo, se observó que dependiendo de las concentraciones y la aplicación de las NPs antes o después de la semilla incidió sobre la respuesta del sistema antioxidante y colateralmente de las semillas al déficit hídrico. Sin embargo, bajo estrés hídrico, se observó una contribución limitada de los nanomateriales y G-B en la germinación de *Zea mays*. A pesar de ello, algunos tratamientos mostraron aumentos significativos en biomasa, indicando respuestas adaptativas al estrés hídrico y no estrés.

Palabras clave: nanopartículas; radicales libres; germinación, osmoprotección.

ABSTRACT

The positive impact of nanoparticles (NPs) on plant growth and resistance, mitigating water stress, has been widely studied. Nanomaterials such as multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) play a crucial role in nanoagriculture by stimulating growth, accelerating germination, and strengthening plant resistance to various stresses. These findings underscore the potential of NPs to enhance agricultural productivity and address environmental challenges. On the other hand, the use of metal-based nanoparticles such as ferrites, which may be doped with metals like Mg, for the benefit of plants, is being explored. However, the role these can play in plant systems is still unclear. Additionally, the positive effect of compounds like glycine-betaine (G-B) in reducing water stress in plants has been documented, but synergy with organic or metallic nanoparticles has not been documented. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of carbon nanotubes and magnesium ferrite in synergy with glycine-betaine as an alternative to stimulate the antioxidant response in *Zea mays* cultivated under water stress conditions.

Results obtained with MWCNT with and without G-B interaction revealed significant differences during the germination of this grass when applied from the initial phase (before sowing), whether supplemented individually or combined with G-B, in the germination processes under stress. On the other hand, MgFe_2O_4 NPs showed that nanoparticles individually or with G-B promoted higher germination rates compared to control seeds. It was also observed that depending on the concentrations and the application of NPs before or after seeding, it influenced the response of the antioxidant system and, collaterally, the seeds to water deficit. However, under water stress, a limited contribution of nanomaterials and G-B to the germination of *Zea mays* was observed. Nevertheless, certain treatments showed significant increases in biomass and enzymatic activity, indicating adaptive responses to water stress and non-stress.

Key words: nanoparticles; free radicals; germination; osmoprotection.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. Nanobiología

En el transcurso del siglo XX, llamado el siglo de la ciencia y tecnología y en particular, en su último decenio, progresos considerables en ciencia y tecnología han producido cambios transcendentales en el mundo (Picquart, 2009). El surgimiento de las denominadas nanociencia actualmente representa una innovadora concepción que está ayudando a modificar los antiguos y tradicionales métodos de investigación. Es importante destacar, la aplicación de la nanociencia y la nanotecnología en la biología, por su gran impacto en el sector alimenticio, la biomédica y en el sector agrícola.

1.2. Nanobiotecnología

La nanotecnología se ha convertido en una de las tecnologías incipientes que ha revolucionado el desarrollo industrial, tecnológico y científico (Vithanage et al., 2017) en la física de materiales para la manufactura de polímeros, sensores o producción de dispositivos eléctricos y electrónicos (Khan et al., 2019); es la ciencia y la ingeniería detrás del diseño, síntesis, caracterización, alteración, manipulación y aplicación de materiales, superficies y dispositivos funcionales para fabricar materiales a escala nanométrica (Vithanage et al., 2017; Golhani et al., 2020).

El desarrollo de nuevos nanomateriales dirigidos al beneficio de los sistemas biológicos es un parteaguas en el estudio multidisciplinario que ha influido fuertemente en la biomedicina para el desarrollo de nuevos fármacos (Nair et al., 2010; Schmidt & Storsberg, 2015), la terapia antimicrobiana (Gupta et al., 2017; Jabir et al., 2018) en el desarrollo de alimentos de mayor calidad, seguridad y una vida útil más prolongada (Milinčić et al., 2019; Simbine et al., 2019) y también converge ampliamente en el estudio en áreas ambientales, energías renovables y en la agricultura, donde se está innovando en el desarrollo de nuevos nanomateriales, para reducir el uso de insumos químicos o reducir los efectos negativos derivados del cambio climático (Raliya et al., 2018; Ha et al., 2019;; Ramírez-Rodríguez et al., 2020).

La nanotecnología ha permitido generar compuestos a escala nanométrica, lo que los dota de propiedades fisicoquímicas únicas, en comparación con sus contrapartes a mayor escala, las cuales pueden tener características biológicas, químicas o físicas especiales, estas propiedades pueden variar según el tipo específico de nanomaterial, pero algunas características generales incluyen su morfología y naturaleza química.

Asimismo, los nanomateriales tienen una gran área superficial en relación con su volumen, esto les confiere propiedades únicas en términos de reactividad química, absorción y adsorción de sustancias, de igual forma las propiedades mecánicas de los nanomateriales son en cierto caso mejoradas al presentar una mayor resistencia, dureza, maleabilidad y elasticidad. Algunas de las nanopartículas (NPs) tienen un comportamiento magnético, y estar consideradas dentro de los compuestos con superparamagnetismo, que puede ser aprovechado en aplicaciones tecnológicas (Ahumada et al., 2019).

Las nanopartículas se definen como partículas dispersas o partículas sólidas con un tamaño en el rango de 10-1000 nm, por definición, se considera un nanómetro como una millonésima parte de un milímetro, por lo que es considerada una medida no visible para el ojo humano. Además, el nano-objeto es el material que es poseedor de una o más dimensiones periféricas con una dimensión en nano-escala. De este concepto partimos para definir a una nanopartícula (Jeevanandam et al., 2018). Los nanomateriales hacen referencia a materiales que en su composición física tienen uno o más dimensiones externas, o bien al interior de su estructura es en nanoescala (Amaya & Quiroga, 2019a).

1.3. Clasificación de las Nanopartículas

La síntesis y el procesamiento de nanomateriales y nanoestructuras es considerado en el aspecto esencial de la nanotecnología y da paso a la clasificación de las nanopartículas y los nanomateriales que están a disposición de materiales nanoestructurados de acuerdo con su naturaleza química, forma y su procedencia (método de síntesis).

De acuerdo con los métodos de síntesis, las nanopartículas pueden ser de origen natural o artificial (Cao & Wang, 2004).

1.4. Nanopartículas de origen natural

Estudios exhaustivos se han realizado sobre la obtención de nanopartículas a partir de métodos amigables con el ecosistema. La biosíntesis o síntesis “verde” de nanopartículas, representa una alternativa respetuosa con el ambiente, limpia, segura, y en los que puede alcanzarse una alta productividad y pureza de nanopartículas (Salem & Fouda, 2011). En este bioproceso, se aprovechan las capacidades naturales de bacterias, hongos, levaduras, algas, virus, actinomicetos y/o extractos de plantas para transformar compuestos orgánicos e inorgánicos en nanopartículas a través de procesos de oxidación/reducción de iones metálicos por biomoléculas (enzimas, proteínas, azúcares, carbohidratos, etc.) secretadas por microorganismos o disponibles en extractos vegetales (Narayanan & Sakthivel, 2010; Nasrollahzadeh et al., 2019).

Existen métodos directos o indirectos para la síntesis de nanopartículas considerando la composición de los precursores, puede ser proteínas, grasas, polímeros, metales, óxidos, etc, estos es clave para lograr la caracterización de las NPs y aprovechar su importancia dadas sus propiedades superficiales y características fisicoquímicas (Gómez-Gaete, 2014). En la Figura 1, se muestra un esquema representativo de algunos de los métodos de biosíntesis de nanopartículas).

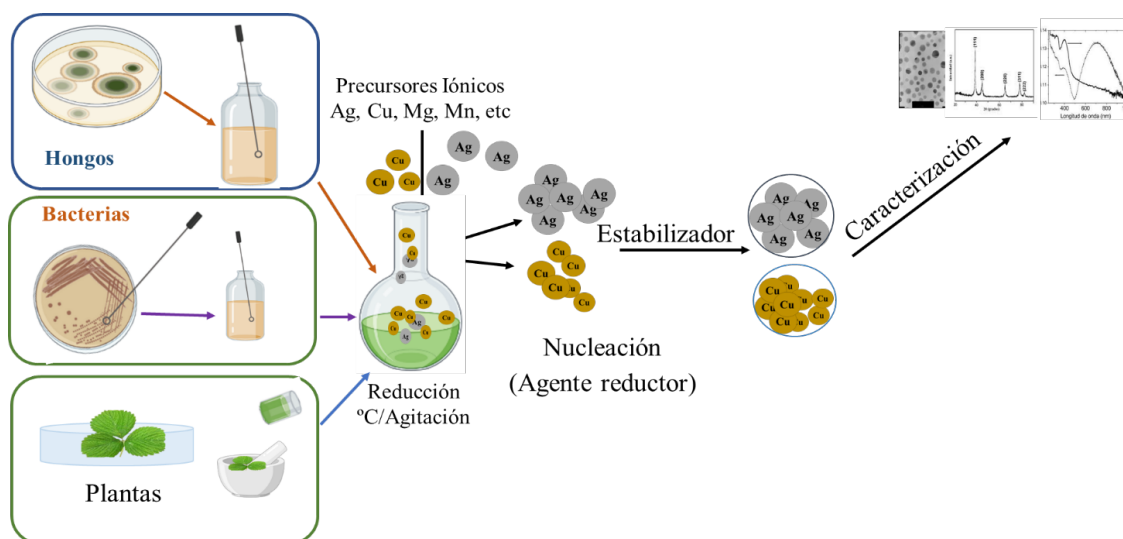


Figura 1 Biosíntesis de nanopartículas. Figura propuesta en Laboratorio de Interacción suelo Planta Microorganismos-IIQB-UMSNH.

1.5. Nanopartículas de carbono cristalino (grafeno)

Las nanopartículas a base de carbono cristalino, es decir, a base de grafeno, pueden obtenerse a partir de precursores bióticos (árboles, plantas, espumas marinas) o generarse de condiciones extremas como en los volcanes o incendios forestales, es decir eventos naturales; en cuanto a las nanopartículas artificiales o de síntesis química, estos son obtenidos en procesos de fabricación industrial, principalmente por los como ablación con láser, descarga de arco y la deposición química de vapor (Cao & Wang, 2004).

1.6. Clasificación de las NPs de acuerdo con su morfología

Las NPs pueden presentar morfologías diversas, cilíndricas, esféricas, elipsoidales, tubulares y helicoidales, principalmente. La morfología de las NPs influye directamente sobre las aplicaciones potenciales de estas.

Las NPs de carbono suelen adoptar formas como esferas huecas, elipsoides o tubos, por ejemplo, los nanotubos y los fullerenos, mientras que las NPs a base de metales incluyen los puntos cuánticos, nanopartículas de oro y plata y óxidos metálicos (Linàs & Sánchez-García, 2013), en la Figura 2 se muestran algunas de las estructuras típicas de las NPs).

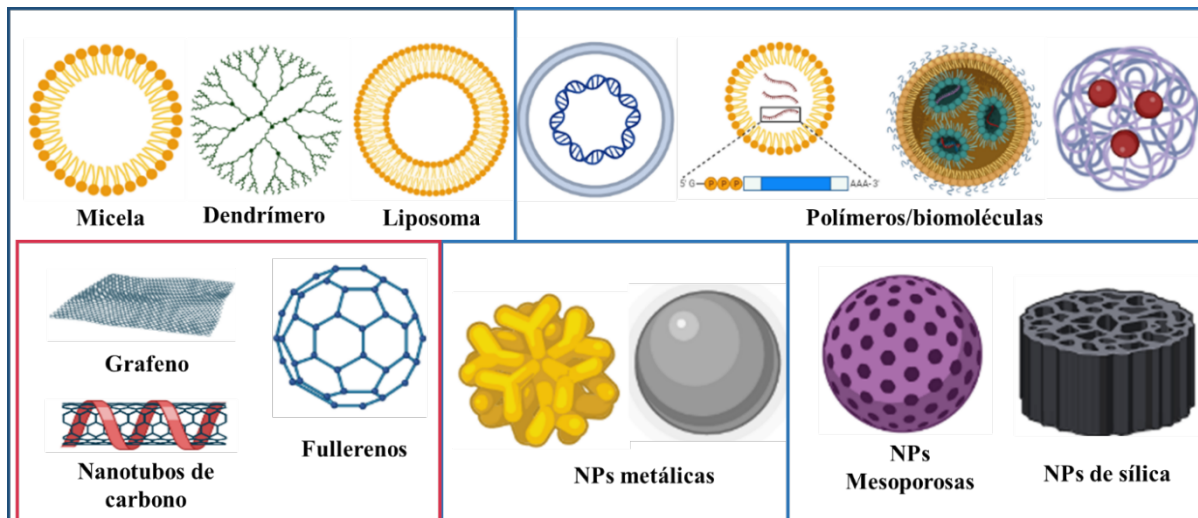
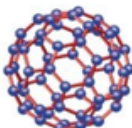
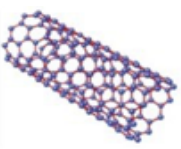
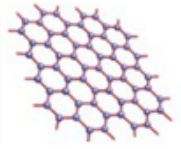
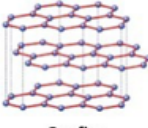


Figura 2 Estructuras típicas de nanopartículas de carbono cristalino y metálicas. Figura propuesta en Laboratorio de Interacción suelo Planta Microorganismos-IIQB-UMSNH.

1.7. Clasificación de las NPs de acuerdo con morfología

Las dimensiones espaciales de las nanopartículas no siempre son constantes y obedeciendo a su aspecto dimensional pueden ser clasificadas en cuatro grupos según la organización internacional de normalización ISO: la dimensión cero o bien (0-D), unidimensional (1-D), bidimensional (2-D) y tridimensional (3-D) (Amaya & Quiroga, 2019a) en la Tabla 1 se muestran ejemplos de NPs de acuerdo con normalización ISO).

Tabla 1. Clasificación y estructura de las nanopartículas.

Estructura	Definición	Nanomateriales
Cero Dimensional (0D)	Las tres dimensiones son menores a $(x,y,z)<100\text{nm}$ y los electrones están confinados en dos dimensiones  Fullereno	Nanopartículas: -Fullerenos. -Puntos cuánticos. -Virus, proteínas. -Partículas coloidales.
Uni Dimensional (1D)	$2D<100\text{ nm}$  Nanotubos de carbono	-Nanotubos. -Nanofibras. -Fibras poliméricas. -Nanocables.
Bi Dimensional (2D)	$1D<100\text{ nm}$  Grafeno	-Monocapas. -Nanorrecubrimientos. -Películas poliméricas.
Tridimensional (3D)	Ninguna dimensión es menos a 100 nm  Grafito	

(Amaya & Quiroga, 2019b)

1.8. Clasificación de las NPs de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas

Dentro de la clasificación de las NPs podemos encontrar los siguientes grupos: NPs conductoras, semiconductoras o superconductoras, pueden ser magnéticas y supermagnéticas y de acuerdo con su naturaleza química estas pueden ser metálicas u orgánicas (Díaz-Dávila et al., 2020).

1.8.1. Nanopartículas orgánicas a base de grafeno

1.8.1.1. Nanotubos de carbono

Dentro de los avances más notables en la nanotecnología que han sido desarrollados en el siglo XXI, se han publicado la existencia de nanotubos de carbono (NTC). Estos descubrimientos han sido fundamentales para los avances y consolidación de la nanotecnología (Oddone et al., 2012). Recientemente, la producción de NTC se utiliza para aplicaciones en almacenamiento de energía, piezas de automóviles, cascos de barcos, artículos deportivos, filtros, electrónica, recubrimientos, portadores de catalizadores, escudos electromagnéticos, así como con aplicaciones en la biomédica y la agricultura (Yan et al., 2016).

Sumio Iijima fue el responsable del descubrimiento de los NTC en el año de 1991. Observó moléculas tubulares en el hollín formado a partir de descargas de arco eléctricas en grafito.

Los NTC vistos por microscopía electrónica de transmisión, se pueden observar cómo láminas enrolladas en tubos huecos. Dependiendo del número de láminas o capas que los constituyen estos NTC pueden clasificarse en nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT), nanotubos de carbono de pared doble (DWCNT) y nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) (Oddone et al., 2012).

Los nanotubos de carbono de pared múltiple o Multi-walled carbon nanotubes son los NTC que se obtienen con mayor facilidad, y fueron los primeros NTC observados, tienen una estructura de varias capas de grafeno enrolladas y unidas mediante fuerzas Van der Waals entre sí, con diferentes diámetros. Mientras que los nanotubos de carbono de pared única o Single Walled Carbon Nanotube, están formados por una capa de un átomo de carbono de espesor dispuestos en una pared o red hexagonal con forma cilíndrica (Rivas Martínez et al., 2007). Estos CNT son un tubo cilíndrico formado por átomos de carbono, su diámetro de un SWCNT puede ser tan pequeño como 0,3 nm, mientras que el diámetro interior de un MWCNT puede ser superior a 15 nm (Choon et al., 2013).

En la Figura 3 se muestran diferentes formas alotrópicas del carbono cristalino, las cuales tienen en común su organización a partir de láminas o capas de grafeno.

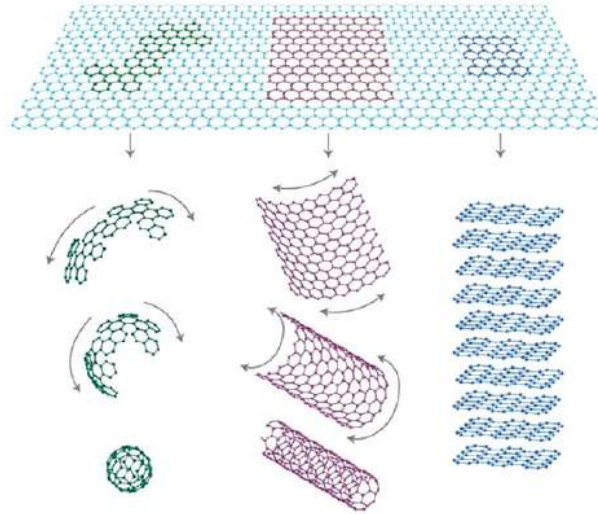


Figura 3 Formas alotrópicas del carbono cristalino (Sengupta et al., 2015).

Los MWCNT están formados de CNT coaxiales de distintos diámetros, distintos autores les dan nombres peculiares como por ejemplo “muñecas rusas” y de una sola lámina que se encuentran en forma de cilindro o una sola lámina enrollada en espiral en un tubo de gran diámetro a este tipo se le conoce con el término más apropiado técnicamente de nano-rollo de carbono (Chen & Zhang, 2009). En la figura 4 se muestra un esquema representativo de los SWCNT y MWCNT.

La estructura en base a grafeno posee una característica de flexibilidad y transparencia que ofrece un encapsulamiento y mediante una modificación de su estructura molecular.

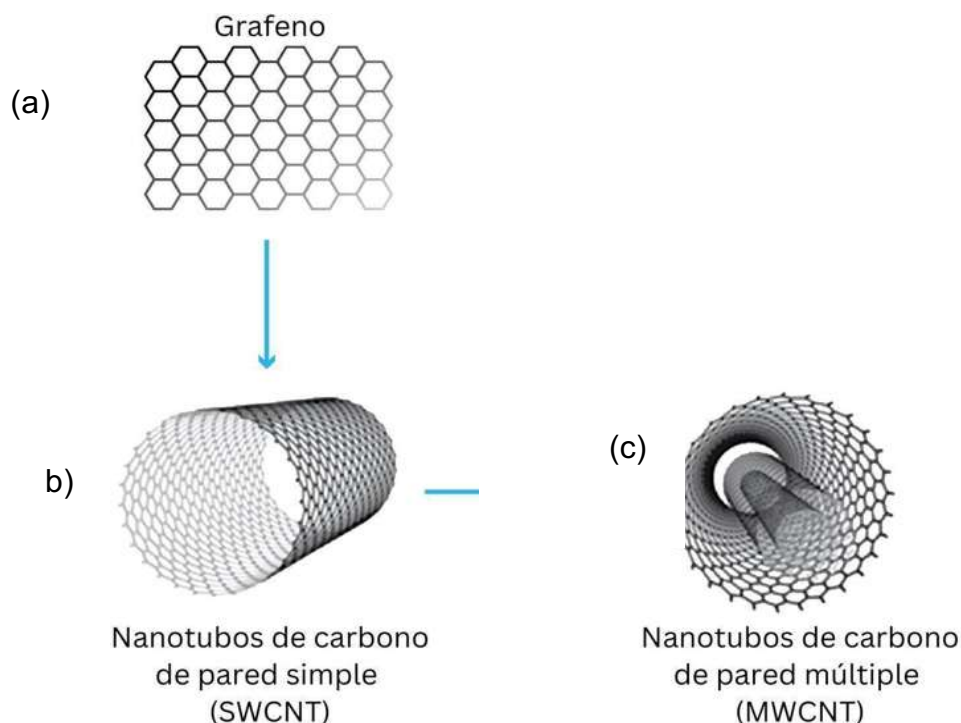


Figura 4 Imagen gráfica de una estructura del grafeno, nanotubos de carbono y de una y varias capas de grafeno (García & Betancur, 2012).

1.8.2. Nanopartículas Inorgánicas a base de óxido ferroso

1.8.2.1. Nanopartículas de Ferrita de magnesio

Por otro lado, el estudio de nanopartículas de metales y óxidos metálicos ha ido en aumento debido a que algunos metales juegan un papel crítico en los procesos bioquímicos.

Dentro del grupo de las nanopartículas metálicas, se encuentran las ferritas, estas NPs pueden estar dopadas con distintos metales, por ejemplo, con Zn, Mn, Mg, etc. Las ferritas de magnesio forman parte del grupo de los óxidos con una estructura de tipo espinela siendo esta una de las más importantes; es decir, que está compuesta de la siguiente forma XY_2O_4 , estas presentan una amplia variedad de propiedades electrónicas y magnéticas que los hacen muy interesantes debido a que el material es semiconductor de tipo n, magnético y blando (Maensiri et al., 2009). Las ferritas de magnesio al tener

propiedades eléctricas y magnéticas se posicionan con una amplia gama de aplicaciones, la ferrita de magnesio se considera un catalizador de reacciones bioquímicas (Medina Chanduví et al., 2020). Se ha documentado que los efectos o las propiedades magnéticas de las ferritas de magnesio se debe fundamentalmente a su tamaño y características de su superficie, que les confiere propiedades superparamagnéticas derivadas de la energía asociada con la inversión de la magnetización (Virden et al., 2007). La ferrita de magnesio está compuesta de una mezcla con una relación molar de 1:1, por ejemplo, para MgO , o para la forma Fe_2O_3 una relación 1:2 de los cationes Mg^{+2} y Fe^{+3} para tener una efectiva dispersión (Medina Mendoza et al., 2017). Actualmente, estas nanoestructuras de MgFe_2O_4 se han mostrado mayoritariamente en forma de nanopartícula (Maensiri et al., 2009).

La nanopartícula de ferrita de magnesio posee características de altas capacidades de interacción con otras nanopartículas; dando lugar a interacciones ferromagnéticas, así como a funciones permeables que se ajustan a una función lineal (Valenzuela, 1994). Las investigaciones sobre ferritas de magnesio a la fecha, sin embargo, han sido poco documentadas, comparado con los estudios científicos dirigidos a comprender los efectos de otras ferritas (Doi et al., 2014).

Se ha documentado que las ferritas son el resultado de la combinación del óxido férrico con otros óxidos metálicos y en su transición estos pueden ser magnetizados de acuerdo con tipos de ordenamiento, estos a su vez pueden poseer propiedades que tienen una dependencia conforme a su composición y microestructura: magnéticas y ferromagnéticas y estas pueden ser activadas cuando se encuentran dentro de un campo magnético (Aquino et al., 2011; Islam et al., 2020).

1.9. La Nanoagricultura

El concepto de Nanoagricultura surgió en la última década, debido a los efectos potenciales documentados de interacción en nanoestructuras biológicas con

nanopartículas en la promoción del desarrollo de diversas especies (Mukhopadhyay, 2014; Fayaz et al., 2020). El estudio de estos nanomateriales se ha centrado en el desarrollo de estrategias innovadoras que mejoren el crecimiento de las plantas de interés agrícola y forestal principalmente, para ello, se explora la generación de sistemas de monitoreo de la calidad nutricional del suelo-planta y elaboración de nanofertilizantes para mejorar el desarrollo vegetal (Lahiani et al., 2013; Yuan & Dai, 2017); reducir los efectos negativos causados por el estrés ambiental (Nair et al., 2010; Chen & Yada, 2011) lo anterior resulta trascendental, debido a que actualmente enfrentamos una problemática ambiental creciente, que afecta suelos y mantos acuíferos.

Uno de los objetivos principales de la nanoagricultura es hacer que las plantas sean capaces de eficientar la asimilación de los nutrientes para una mayor productividad a través de nanopartículas que garanticen la seguridad y cuidado del medio ambiente (Mukhopadhyay, 2014). La industria agrícola se ha preocupado por investigar nuevas fuentes que enriquezcan al campo y dentro de este nuevo desarrollo agrícola han implementado la aplicación de NPs de tipo metálicas para mitigar los efectos tóxicos en las plantas, aumentando su tolerancia al estrés abiótico (Ul Hassan et al., 2022), o con aplicaciones como fertilizantes y pesticidas. Existe información documentada que indica que el estudio de las nanopartículas ha sido ampliamente explorado en cultivos vegetales de interés forestal y agrícola, reportando efectos que han sido benéficos en el desarrollo de las plantas. Los nanomateriales deben facilitar procesos que garanticen la disponibilidad de nutrientes para las plantas en la proporción y forma que éstas demandan (Mukhopadhyay, 2014), de igual forma se han dado a conocer propuestas con distintos mecanismos de acción.

1.10. Efecto de los MWCNTs sobre las plantas

Debido al gran impacto que se ha venido desarrollando en la última década, la nanoagricultura ha mostrado poseer efectos positivos documentados de nanopartículas como los MWCNT de origen sintético o natural en la promoción del crecimiento de

diversas especies vegetales, como *Eysenhardtia polystachya*, *Lupinus elegans*, *Zea mays*, Híbrido de *Glycin max*, *Hordeum vulgare* (Lahiani et al., 2013; Tiwari et al., 2014), *Brassica oleracea*, *Daucus carota*, *Cucumis sativus*, *Allium sp.*, *Cicer arietinum* (Cañas et al., 2008; Tripathi et al., 2011). Algunos reportes en plantas de origen forestal demostraron que los MWCNT sintéticos y MWCNT naturales (Lara-Romero et al., 2017; Juárez-Cisneros et al., 2020) aceleraron la emergencia temprana de las semillas e incrementaron el porcentaje de germinación. Mientras que en plantas de interés agrícola los efectos de los MWCNT sintéticos han sido más ampliamente explorado donde también se ha documentado el efecto de estos nanomateriales en la emergencia temprana de semillas y estimulación de la germinación de las semillas. Dichos efectos se han atribuido a una mayor absorción de agua al interior de la semilla, causado por los MWCNT, lo que colateralmente estimula la actividad metabólica necesaria en este proceso, causando así la emergencia temprana de la radícula (Khodakovskaya et al., 2013; Lara-Romero et al., 2017). Otros autores han sugerido que la germinación de semillas expuestas a los MWCNT, fuertemente se asocia a la expresión de genes reguladores de acuaporina (Lahiani et al., 2018). Los efectos positivos de los MWCNT, también se han documentado en otros estados del desarrollo vegetal, donde estas nanopartículas favorecen el establecimiento y captación de agua y nutrientes al mejorar el desarrollo de la arquitectura radical, estimular la síntesis de clorofila y favorecer la tasa fotosintética (Joshi, Kaur, Dharamvir, et al., 2018; Joshi, Kaur, Singh, et al., 2018).

Algunos estudios han sugerido que los MWCNT pueden estimular la germinación de las semillas de diversas especies vegetales, debido a su efecto sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el H_2O_2 . Para Bewley, la germinación es el número consecutivo de eventos que provocan que una semilla en estado quiescente con bajo contenido de agua, inicie la captación de esta última, mostrando un aumento en su actividad metabólica en general y, dando lugar a la emergencia de la radícula a partir del embrión, Matilla lo explica como una alta tasa de divisiones nucleares por lo cual trae consigo un aumento notable del número de células que se encuentran desarrollándose en el embrión (Matilla, 2016). Las ROS son componentes para regular positiva o negativamente la germinación de las semillas. En condiciones de humedad adecuadas

para la germinación, las ROS desempeñan un papel importante en eventos como el debilitamiento del endospermo y la movilización de las reservas de semillas.

1.11. Efecto de las nanopartículas metálicas sobre las plantas

El uso de nanopartículas metálicas en los sistemas vegetales ha sido ampliamente documentado, especialmente tratándose de nanopartículas a base de óxidos de algunos metales, y se ha documentado su efecto positivo en las plantas, desde estadios tempranos de desarrollo. Por ejemplo, (Javed et al., 2017) informaron sobre un estudio para abordar los efectos de diferentes concentraciones de nanopartículas de ZnO. Estos autores informaron un efecto positivo del ZnO a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ por encima del porcentaje de formación de brotes, una mejora de los glucósidos de esteviol, un aumento de la actividad eliminadora de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, la capacidad antioxidante total, el poder reductor total, los flavonoides totales, así como el contenido fenólico total. Sin embargo, a una concentración de 1000 mg L^{-1} de nanopartículas de ZnO se detectó un efecto fitotóxico.

Además, en el año 2017 informaron que la aplicación de nanopartículas de óxido de zinc portadoras de ligandos de ficomoléculas en algodón (*Gossypium hirsutum* L.) en un rango de concentraciones de $25\text{-}200 \text{ mg L}^{-1}$ registró un aumento en el crecimiento y la biomasa total, aumentó en el nivel de clorofila A, carotenoides y contenido total de proteínas solubles (Venkatachalam et al., 2017).

Además, para el año 2021, informaron un efecto beneficioso de las NP de ZnO sobre *Lycopersicon esculentum* Mill, al generar en esta planta una mayor tolerancia al estrés de tolerancia salino, al mismo tiempo que documentaron un aumento significativamente la longitud de los brotes y las raíces, la biomasa, el área foliar, el contenido de clorofila y la actividad fotosintética (Faizan et al., 2021). El uso de nanopartículas de óxido de manganeso (III) también se ha estudiado en plantas de *Capsicum annuum* L. sometidas a estrés salino. Los resultados mostraron la penetración de nanopartículas de Mn a través de la cubierta de la semilla y colateralmente provocaron cambios de composición e interacciones moleculares entre biomoléculas clave implicadas en el manejo del estrés

salino de las plantas (Ye et al., 2020). Otro estudio evaluó el efecto del nanomanganeso-Mn sobre el rendimiento del *Triticum aestivum* y la adquisición de nutrientes. Sus hallazgos indicaron que la exposición al Mn a nanoescala en el suelo podría modificar la adquisición de N y P por parte de las plantas (Dimkpa et al., 2018).

En *Atropa belladonna* L., la exposición a NPs de Mn_2O_3 provocó cambios en el número de raíces y brotes por explante, longitud de raíces y brotes, y peso fresco de raíces y brotes; además, se detectaron cambios fisiológicos, como el contenido relativo de agua de las hojas, contenido total de clorofila, peróxido de hidrógeno y malondialdehído, fuga de electrolitos e índice de estabilidad de la membrana mediante la alteración del contenido de proteínas y la activación de enzimas antioxidantes y de defensa (Tian et al., 2018).

Las ferritas dopadas con metales magnéticos han sido recientemente estudiadas con una gran variedad de aplicaciones (Srinivasan et al., 2018), debido a sus múltiples propiedades como alta permeabilidad, alta magnetización de saturación (Streckova et al., 2015). En las plantas se han documentado efectos contrastantes con ferritas de zinc, cobalto, manganeso y plata (López-Moreno et al., 2016; Tombuloglu et al., 2018; Abu-Elsaad & Abdel hameed, 2019; Thakur et al., 2020; Abdelhameed et al., 2021).

Sin embargo, a pesar del gran avance en el conocimiento sobre la interacción nanopartículas-planta, es imperativo comprender el papel que juegan estas nanopartículas magnéticas en la respuesta de las plantas (Ju-Nam & Lead, 2008; Verma et al., 2018)

El conocimiento de las propiedades intrínsecas de las nanopartículas, por ejemplo, sus propiedades magnéticas, forma, composición y pureza, así como su estabilidad, adhesión y grado de dispersión (Handy et al., 2008; Jackson et al., 2013), es de gran importancia, ya que influyen en la absorción, distribución y translocación de nanomateriales a través de barreras fisiológicas de plantas (Liu et al., 2014; Astefanei et al., 2015). Estudios recientes han demostrado que las plantas tienen una influencia de los campos magnéticos que protegen a la tierra, estos impactan no solo a los sistemas vegetales, sino que también influyen en todos los seres vivos. Debido a su gran importancia han sido motivo

de diversos estudios, pero para nuestro enfoque agrícola, se ha documentado la importancia de la actividad biológica vegetal que se lleva a cabo por la influencia de este electromagnetismo (Belyavskaya, 2004). Diversos estudios han presentado sus resultados al demostrar que existe una amplia gama de efectos en el sistema de crecimiento vegetal respecto al efecto de crecimiento con interacciones de campos magnéticos en diferentes intensidades (Belyavskaya, 2004). Se tienen también varios reportes registrados en años donde se demuestra que se observaron incrementos significativos en las actividades de desarrollo de las plantas, proporcionando un efecto benefactor en etapa temprana, germinación, crecimiento, aumentos de peso fresco y seco, aumento también en la actividad enzimática, así como diversas concentraciones de elementos químicos, entre ellos el magnesio y el hierro (Carbonell et al., 2017). Existen varios estudios en los cuales se hacen referencia a la implantación de iones de hierro al magnesio el cual por muchas razones ha sido de interés de estudio científico y práctico (Perez et al., 1983).

1.12. El magnesio en las plantas

El magnesio (Mg) tiene una densidad de $1,7 \text{ g/cm}^3$, es considerado el menor de los metales estructurales, presenta características que son clasificadas en moldeables, también puede recibir aleaciones que pueden ser realizadas térmicamente y es catalogado como un mineral fundamental para el desarrollo vegetal, es un elemento esencial para las plantas; es considerado un macronutriente necesario para el crecimiento normal en los alimentos vegetales y como fuente de magnesio lo podemos encontrar en diversas verduras, fruta semillas y legumbres, este mineral impacta en la estructura de los cloroplastos, tiene una influencia en la actividad fotosintética siendo este un componente principal en la clorofila (Xiao et al., 2014; Martínez, 2019). En diversos estudios se han presentado trabajos donde se han evaluado los niveles de concentración del magnesio y se ha documentado que en las plantas han presentado incremento en el desarrollo del tallo y hojas, mientras que en ausencia de éste presentan un decremento en el factor del crecimiento (Xiao et al., 2014). Por otra parte, existen algunos

antecedentes de los efectos y función que puede causar el magnesio en los sistemas vegetales dentro de los procesos de actividad enzimática para el desarrollo de la planta y el desarrollo de la fotosíntesis, teniendo efectos de igual forma a nivel molecular en procesos esenciales de la clorofila, colaborando con la mitigación de estrés fotooxidativo en las plantas (Oliveros Díaz et al., 2023).

1.13. Las plantas y su respuesta al estrés

Las plantas están expuestas con frecuencia a tensiones oxidativas causadas por factores tanto bióticos como abióticos. Bajo estrés, se producen enormes cantidades de ROS que pueden causar peroxidación, lo que da como resultado daño a las membranas celulares, oxidación de proteínas, inhibición de enzimas y rotura de cadenas de ácidos nucleicos; además, la producción de ROS es inevitable, ya que se generan en las reacciones redox de las plantas, incluidas la respiración y la fotosíntesis (Singh et al., 2016; Foyer, 2018). Sin embargo, en la última década, se ha profundizado en el papel de ROS en las plantas, ya que también juegan un papel importante en la señalización de procesos de desarrollo de las plantas; por ejemplo, en la proliferación y diferenciación celular, la muerte celular programada y la germinación de semillas (Qi et al., 2018). La regulación de ROS en las plantas se lleva a cabo principalmente por enzimas como el superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasas (POX), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR) (Noctor et al., 2018).

1.14. Las nanopartículas y el estrés hídrico vegetal

Diversas investigaciones han documentado el efecto de las nanopartículas no solo en la promoción del crecimiento vegetal, sino que se ha demostrado la importancia de estas para reducir los efectos negativos del estrés en las plantas. Algunos autores sugieren que las nanopartículas son capaces de mejorar la respuesta de defensa de las plantas expuestas a condiciones de estrés salino, donde se demostró que los MWCNT al ingresar a las células en la planta, estimularon una mayor absorción de agua y una mayor

asimilación neta de CO₂. Por otro lado, se ha propuesto que nanopartículas como los MWCNT tienen la capacidad de inducir una mayor captación de agua al interior de las semillas y las plantas, por mecanismos que aún son poco claros; sin embargo, los beneficios asociados a dicho efecto parecen tener estrecha relación con la velocidad de la germinación de semillas y estimulación del desarrollo temprano de las plántulas, así como de una mayor tolerancia de estas a condiciones de estrés salino o hídrico. Algunos de los efectos que se han propuesto al adicionar MWCNT en plantas incluyen cambios en la composición lipídica, la rigidez y la permeabilidad de las membranas plasmáticas de la raíz, lo que mejora la absorción y el transporte de agua, aliviando los efectos negativos del estrés salino (Shala & Mahmoud, 2018; Annunziata et al., 2019a). Otros autores documentaron que los MWCNT también están implicados en la protección de las plantas contra el estrés oxidativo, donde se estudia su participación como moléculas que imitan el papel de las enzimas antioxidantes como SOD, CAT y POX (Khan et al., 2017); sin embargo, la participación de estas nanopartículas aún ha sido poco estudiada. De igual forma se han estudiados la interacción que tienen las nanopartículas metálicas en algunos sistemas vegetales y las reacciones que tienen respecto a la generación de especies reactivas de oxígeno, documentando diversos efectos en la cuantificación de clorofila, toxicidad, fotosíntesis, absorción de luz, fluorescencia etc.(Siddiqui et al., 2015). Sin embargo existe muy poca información de los efectos que puede tener en la protección y efectos positivos en sistemas vegetales sometidos a estrés hídrico.

1.15. Papel de la glicina-betaína en el déficit hídrico vegetal

Se ha estudiado el papel de la glicina-betaína (G-B) como un mecanismo de defensa de las plantas para incrementar su tolerancia al estrés. Diversas plantas tienen la capacidad de sintetizar G-B en respuesta a las limitaciones ambientales, es un compuesto que tiene un papel importante para contrarrestar el estrés al ser uno de los componentes osmoprotectores en las células vegetales, que sirve como mecanismo de las plantas para aumentar la tolerancia al déficit hídrico al preservar la actividad de las macromoléculas, manteniendo la integridad de las membranas contra el estrés y eliminando ROS (Shala &

Mahmoud, 2018; Annunziata et al., 2019a). Se ha documentado que la aplicación de la glicina- betaína ayuda significativamente ofreciendo diversos beneficios en el crecimiento y desarrollo de las plantas, además de que ofrece una considerable tolerancia de las plantas al estrés abiótico y este la realiza mediante la desintoxicación de ROS (Siddiqui et al., 2015). La glicina- betaína es un compuesto no tóxico que tiene acciones protectoras contra diferentes tipos de estrés eliminando los efectos negativos que pudieran causar. Entre las diversas funciones que tiene como objetivo la G-B es un acomodo osmótico celular con el cual eficientiza el uso del agua (Ganjavi et al., 2021). Debido a que es un aminoácido libre y un soluto compatible, la G-B mantiene los orgánulos celulares como es la mitocondria y los cloroplastos como un sistema osmótico celular (Tisarum et al., 2020). Diversos autores han documentado la variedad de características benéficas del sistema G-B, como el mejoramiento de la tasa fotosintética, extintor de las especies reactivas de oxígeno, ofrece protección enzimática contra el estrés etc. (Ganjavi et al., 2021). Es por todo lo anterior que la G-B tiene una influencia positiva en el crecimiento de las plantas y en los aspectos fisiológicos en condiciones de déficit hídrico y salino, eliminando así cualquier estrés abiótico, reteniendo aún más la G-B cuando es expuesto al estrés por agua (Tisarum et al., 2020).

1.16. Maíz

El maíz es uno de los cultivos básicos más importantes y extendidos en todo el mundo. Constituye una de las fuentes principales de alimento de millones de personas, ya que es una de las plantas más cultivadas alrededor del mundo considerándose un alimento básico sobre todo en América y Asia. Se trata de una de las primeras plantas que se domesticaron y se difundieron por todo el mundo, es también utilizado como materia prima de un gran número de productos industriales, así como para la ganadería, este cereal es de interés científico para su análisis y modificación genética (Ortega, 2014; Perales & Golicher, 2014).

1.17. El maíz y estrés hídrico

Se ha documentado en diversos estudios el efecto que causa el riego en el maíz, se han utilizado diversos métodos de riego en los cultivos del maíz, durante todo el proceso de crecimiento de la planta; no obstante, la aplicación del riego constante que satisfaga la totalidad de los requerimientos del cultivo ha sido observado a nivel global y esto, por el volumen que se consumen para el riego, como efecto negativo que produce al medio ambiente (Cassinoni, 2012). Sin embargo, existen nuevas estrategias para mejorar la eficiencia y el aprovechamiento de la aplicación del riego con agua y reducir los efectos negativos que pueden tener en la aplicación del consumo excesivo hídrico sobre el medio ambiente y su impacto en la parte económica en los cultivos (Ferreles & Soriano, 2007). Es cierto que el estrés hídrico sobre el maíz tuvo diversos efectos derivados debido a los déficits de la aplicación de agua durante las diferentes etapas del desarrollo de la planta (Claassen & Shaw, 1970), fueron analizadas y documentadas varias etapas del ciclo del desarrollo de la planta (etapa vegetativa, desarrollo productivo, fotosíntesis, desarrollo de órganos) enfrentándose a un estrés hídrico (Schussler & Westgate, 1995; Çakir, 2004), teniendo un impacto final en los componentes del rendimiento de la planta, en la cual se destaca la sensibilidad del maíz en la etapa importantes durante su desarrollo de acuerdo a la intensidad y etapa del ciclo que se estén produciendo. Una de las etapas es la reproducción y el estrés hídrico reduce el número de granos debido a los bajos promedios en la fotosíntesis (Otegui et al., 1995; Cassinoni, 2012).

La fisiología es una de las ciencias que centra sus estudios en los órganos de los seres vivos y junto con la tecnología de las semillas han aportado importantes hallazgos científicos, dando a conocer distintos tratamientos para las semillas. Es necesario e importante poder contar con una herramienta que nos pueda asistir en la producción y evaluación de las semillas en cuanto a su germinación y poder así establecer un modelo que nos ayude a analizar los comportamientos del desarrollo completo de la semilla (Joosen et al., 2010).

1.18. Anatomía de semilla del maíz y factores que regulan la germinación

El maíz es una de las plantas de cultivo más importantes del mundo (Strable & Scanlon, 2009), la más domesticada y evolucionada del reino vegetal, además de su amplia diversidad genética que a su vez son promotores naturales de la conservación y generación de la biodiversidad (González-Cortés et al., 2016).

También cabe mencionar que este cereal se destaca por el papel significativo que el maíz desempeña como organismo modelo en la investigación biológica como la evolución del genoma, la fisiología del desarrollo, la epigenética, la resistencia a plagas, la heterosis, la herencia cuantitativa y la genómica comparativa (Strable & Scanlon, 2009).

1.18.1. Clasificación Taxonómica

El maíz (*Z. mays*), pertenece a las Gramíneae que es una subfamilia Panicoideae y una tribu de Andropogoneae, en ella se encuentran siete diferentes géneros de maíz (Paliwal et al., 2001).

1.18.2. Estructura del grano de maíz

Esta semilla de maíz en su estado de madurez es considerada un fruto (cariópside) que está formado por cuatro principales partes: el pedicelo, Pericarpio, Endospermo y el Embrión (Watson, 1987).

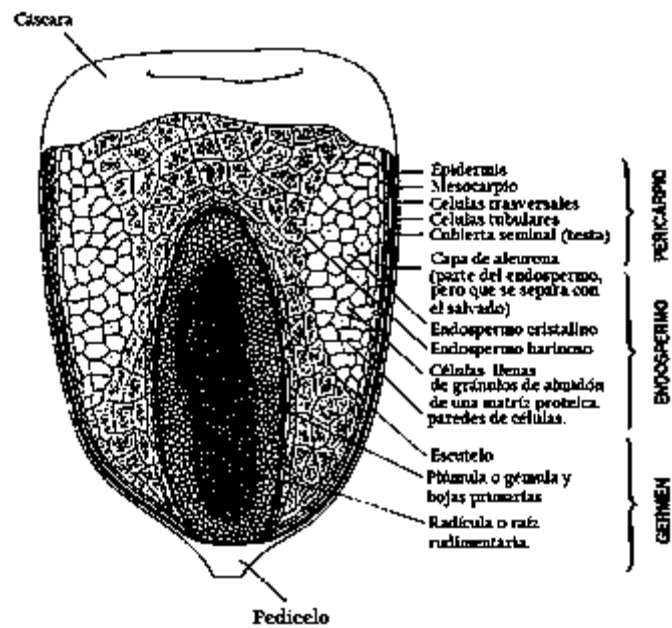


Figura 5 Estructura del grano de maíz (Hoseney & Faubion, 1992).

2. JUSTIFICACIÓN

El efecto positivo de los nanomateriales en las plantas ha sido ampliamente estudiado, debido a los efectos positivos documentados en los diferentes estadios del desarrollo vegetal. Sin embargo, la información actual es insuficiente para comprender el papel que estas nanopartículas desempeñan en las plantas, en especial, cultivadas en condiciones de estrés hídrico, que es uno de los factores limitantes en la germinación y establecimiento de diversas especies de plantas. Por otro lado, compuestos como la glicina-betaína, al ser un compuesto osmoprotector, podría desempeñar un papel sinérgico con los MWCNT para estimular el sistema antioxidante de plantas cultivadas en condiciones de estrés hídrico. Por lo que, estudiar los efectos de las nanopartículas con este modelo, nos puede permitir entender mejor los efectos de estas en los distintos procesos fisiológicos de la planta, así como estudiar esta desde el punto de vista sistémico.

3. HIPÓTESIS

Los nanotubos de carbono y la ferrita de magnesio en sinergismo con glicina betaína, estimularán la respuesta antioxidante favoreciendo la germinación y etapa temprana de *Zea mays* cultivada en condiciones de estrés hídrico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de los nanotubos de carbono y la ferrita de magnesio en sinergismo con glicina betaína, como alternativa para estimular la respuesta antioxidante en *Zea mays* cultivada en condiciones de estrés hídrico.

4.2. Objetivos Particulares

1. Evaluar los efectos de los MWCNT sintéticos y la ferrita dopada con magnesio MgFe_2O_4 en interacción con glicina-betaína sobre variables morfológicas de *Zea mays* cultivada en condiciones de estrés hídrico.
2. Evaluar los efectos de MWCNT sintéticos y ferrita dopada con magnesio MgFe_2O_4 en interacción con glicina-betaína, sobre el sistema antioxidante durante la germinación y etapas tempranas de desarrollo de *Zea mays* cultivada en condiciones de estrés hídrico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de las nanopartículas

5.1.1. Nanotubos de carbono de pared múltiple

Se utilizaron para este proyecto de investigación MWCNT de origen sintético con las siguientes características: diámetro exterior de 6 a 13 nm, diámetro interno de 2,0 a 4,0 nm, longitud de 2,5 a 20 μm , un espesor de pared medio de 7 a 13 capas de grafeno y

una pureza > 98% (Aldrich, Cat 698849(Sigma-Aldrich, 2024)). Los MWCNT fueron analizados por espectroscopía Raman y Microscopía electrónica de transmisión para su caracterización.

Para el uso de estos nanomateriales para los bioensayos, se prepararon tres soluciones en concentraciones de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT sintéticos, fue requerido la elaboración de un stock a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de 5ml de H_2O . Se preparó también una solución con la misma preparación anterior, pero adicionando 5ml de glicina-betaína para mezclarlo a 5,000 μg de MWCNT.

5.1.2. Ferrita de Magnesio (MgFe_2O_4)

Para este estudio se utilizaron nanopartículas de ferrita sintética dopadas con magnesio, las nanopartículas que fueron preparadas en concentraciones de 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ de MgFe_2O_4 diluido en 5ml de H_2O .

La muestra de ferrita de magnesio fue analizada en un equipo BET Nova Touch LX¹ el cual es un analizador de área superficial y de tamaño de poro, para este análisis se tomó la muestra de ferrita de magnesio de 0.3562 g y se colocó en una celda porta muestra en la cual se llevó a una temperatura de 80° centígrados durante 12 h, en sistema al vacío para eliminar el exceso de humedad que pudiera presentar la muestra, posteriormente se adicionó nitrógeno líquido para llevar a cabo el proceso de Adsorción de este en las nanopartículas y posteriormente con el sistema de vacío eliminar el nitrógeno que no se unió a las ferritas, para por diferencia de volumen obtener de forma indirecta el área de superficie y porosidad.

5.1.3. Glicina-Betaína

Por otro lado, la glicina y la Betaína, se obtuvieron de SIGMA-ALDRICH®. Se prepararon soluciones de ferrita a concentraciones de 5, 10 y 20 µg/ml y solución de glicina-betaína a 10 mM (1:1). Esta solución se utilizó para bioensayos *in vitro* y se complementó de forma individual o sinérgica.

5.2. Establecimiento de bioensayos *in vitro* de maíz cultivado con NPs y/o glicina betaína en condiciones de estrés hídrico

Para evaluar los efectos de los MWCNT y ferritas en sinergia con glicina-betaína en semillas de maíz como alternativa de respuesta al estrés hídrico, el trabajo se dividió en dos fases experimentales:

En la fase I las semillas de maíz fueron impregnadas con MWCNT sintéticos o con la ferrita de magnesio MgFe_2O_4 en concentraciones de 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, cada una de ellas con y sin glicina-betaína y, en condiciones de déficit hídrico y sin estrés. En esta primera fase los MWCNT y la ferrita de magnesio se adicionó previamente a la siembra de las semillas.

Para la fase II las semillas de *Zea mays* fueron suplementadas con MWCNT sintéticos o con la ferrita de magnesio MgFe_2O_4 en concentraciones de 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, cada una de ellas con y sin glicina-betaína y, en condiciones de déficit hídrico y sin estrés. En esta segunda fase las NPs no se adicionarán al inicio de la siembra, sino hasta después de la germinación de esta gramínea (estadio temprano de la planta).

5.2.1. Fase I

Para los bioensayos *in vitro* de *Zea mays* suplementados con diferentes concentraciones de MWCNT o ferritas, las semillas de maíz fueron impregnadas con estas nanopartículas,

para ello las semillas con las NPs se mantuvieron en agitación en shaker durante 24 h a 24°C. Posteriormente las semillas fueron sembradas en cajas Petri con papel filtro, adicionando el tratamiento en condiciones de estrés (1ml H₂O) y sin estrés hídrico (2ml H₂O) por cada 5 semillas en cada caja Petri. A continuación, las semillas fueron incubadas en oscuridad durante 68 horas a 24°C, durante este periodo se tomó registro a las 42, 54 y 68 horas para evaluar el porcentaje de semillas germinadas.

Las semillas germinadas se dispusieron de dos maneras: las primeras permitieron obtener la biomasa de las semillas, y la otra parte se destinó para realizar pruebas histoquímicas para determinación de especies reactivas de oxígeno (Li et al., 2017).

Para evaluar la biomasa de las semillas, se midió el de peso fresco y peso seco de las semillas, pesando en peso fresco mediante una balanza analítica, posterior de las 68 horas se llevaron las semillas a secar en horno a 80° C durante 24 horas, posterior a ello se volvieron a pesar en la balanza analítica para obtener el peso seco.

5.2.1.1. Localización histoquímica de especies reactivas de oxígeno (ROS)

5.2.1.1.1. Actividad deshidrogenasa de las semillas

Las semillas cultivadas en las condiciones anteriores fueron teñidas con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC). El TTC es una sal blanca y sustrato de las deshidrogenasas y, su metabolito es un tinte rojo, que hace que la célula se vuelva roja en tejido viable y blanca en tejido muerto. Se disolvieron 0.5 g de TTC en 2 mL de alcohol, posteriormente fue disuelto en 100 mL de H₂O destilada, se almacenó en oscuridad 24 h a 4° C. Una vez pasadas las 24 horas se tiñeron las semillas con la solución con una temperatura de 35° C durante un periodo de tiempo de 3 h, posterior a esto se lavaron con agua destilada tres veces, para remover el reactivo excedente.

5.2.1.1.2. Detección del anión superóxido (O_2^-) en semilla

Las semillas desprovistas del tegumento micropolar se tiñeron durante 60 min con una solución de nitroblu de tetrazolium (NBT) al 0,1% (p/v) en buffer de fosfato de potasio 50 mM con pH 7,5, en la oscuridad (Jabs et al., 1996)

5.2.1.1.3. Determinación de H_2O_2 en semilla

La cuantificación y la localización histoquímica de H_2O_2 se llevarán a cabo mediante tinción 3,3-diaminobenzidine hydrochloride (DAB) y medición colorimétrica. Para visualizar la presencia de H_2O_2 , las semillas se tiñeron con DAB al 0,1% (v/v) en una solución buffer de fosfato de sodio dibásico 20 mM, pH 4,0 (Thordal-Christensen et al., 1997).

Una vez realizadas las tinciones, las semillas teñidas en todos los casos fueron lavadas con agua destilada y se mantuvieron en etanol al 70% a 4°C hasta su análisis. Para cuantificar las ROS, se tomaron fotografías con cámara Nikon DSLR 6600, se cuantificó el área teñida mediante software ImageJ y se procesaron los datos con GraphPad Prism 8.0.1 software.

5.2.2. Fase II

Para llevar a cabo la fase dos, la metodología fue muy similar a la fase I, a excepción del establecimiento del bioensayo inicialmente. En esta fase las semillas fueron vernalizadas en agua destilada durante 24 h a 24°C y se mantuvieron en agitación constante en shaker durante 24 horas a 24°C. Posteriormente las semillas fueron sembradas en cajas Petri con papel filtro sin agregar los tratamientos con las nanopartículas ni glicina-betaína. Posteriormente las semillas fueran incubadas en obscuridad durante 68 horas a 24°C, durante este periodo se tomó registro a las 42, 54 y 68 horas para evaluar la velocidad y porcentaje de semillas germinadas. Se adicionaron los tratamientos con nanopartículas y/o glicina betaína a las 24 horas de la etapa de germinación temprana de la semilla.

En la figura 6 se muestra el diagrama general de la metodología desarrollada para los bioensayos *in vitro* de maíz cultivada en condiciones de estrés hídrico suplementadas con nanopartículas y/o glicina-betaína.

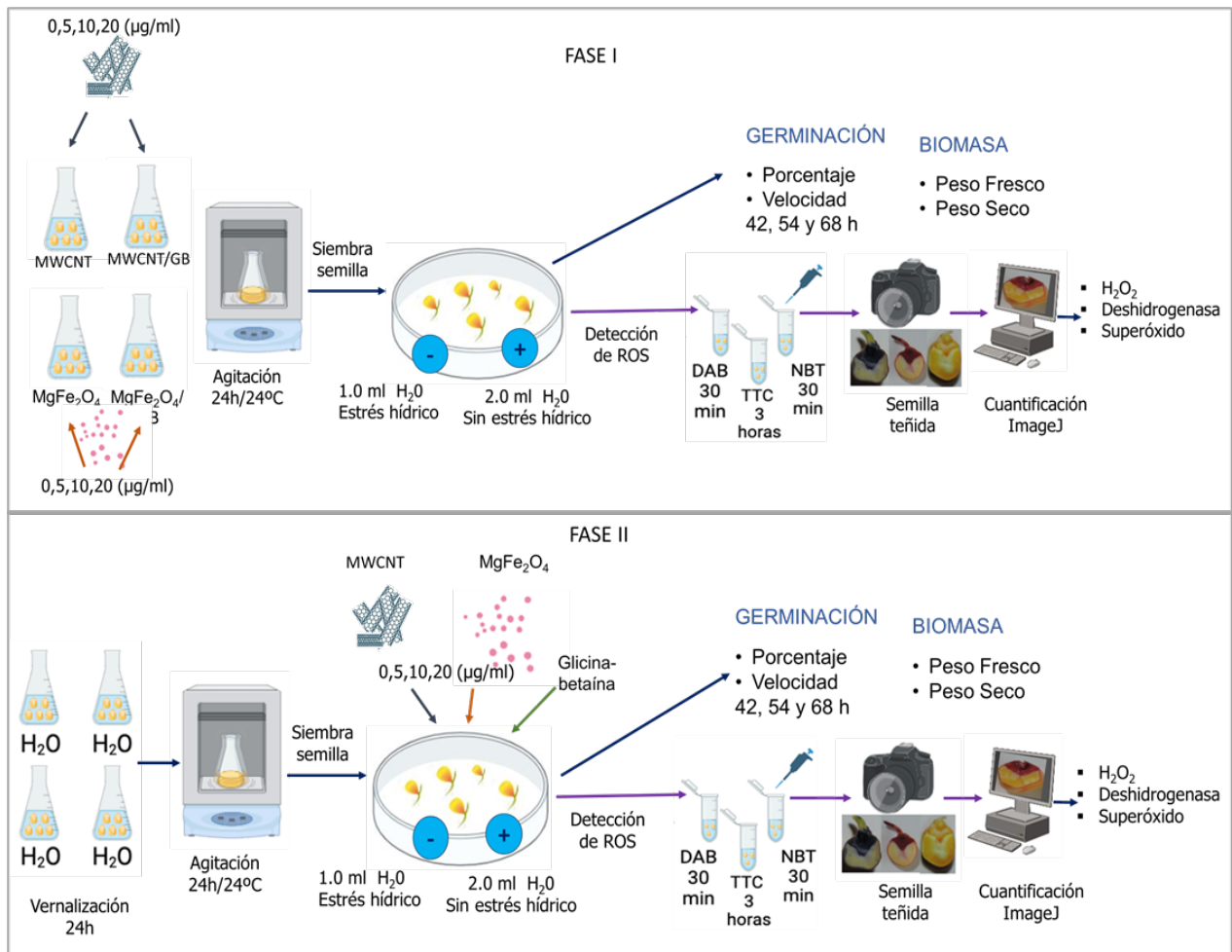


Figura 6 Diagrama general de los bioensayos *in vitro* de maíz cultivada en condiciones de estrés y sin estrés hídrico, suplementadas con nanopartículas y/o glicina-betaína.

5.3. Variables respuesta

Las variables respuesta que fueron evaluadas son las siguientes:

- a. Velocidad de germinación de maíz.
- b. Cambios morfológicos en las semillas durante el proceso de germinación y emergencia de la radícula.
- c. Peso fresco y seco de las semillas.
- d. Se realizaron pruebas colorimétricas que nos dan información sobre la generación de especies reactivas de oxígeno que son indicadores indirectos de estrés causado por déficit hídrico en las semillas (Li et al., 2017).

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un diseño experimental totalmente aleatorio, la unidad experimental consta de cinco semillas en caja petri, con cuatro repeticiones, para tener un total de veinte semillas por tratamiento, los tratamientos aplicados fueron 24. Un total de cincuenta y seis tratamientos por ambas fases.

En la fase 1, se suplementaron las NPs con y sin glicina-betaína desde el inicio de la siembra de la semilla; en la fase 2 se suplementaron las NPs con y sin glicina-betaína a las 24 horas después del cebado con agua destilada, para cada fase con y sin déficit hídrico.

En la tabla 2, se muestra el número total de tratamientos por cada una de las fases en sus diferentes concentraciones y condiciones.

Tabla 2 Tratamientos para bioensayos con maíz expuestas a NPs de MWCNT y MgFe_2O_4 con y sin interacción G-B en condición de estrés y sin estrés hídrico.

Tratamientos	Estrés hídrico	Sin estrés hídrico	Nanopartícula ($\mu\text{g/ml}$)			TOTAL
			5	10	20	
CONTROL	✓	✓	-	-	-	2
G-B	✓	✓	-	-	-	2
MWCNT	✓	-	✓	✓	✓	3
MWCNT	-	✓	✓	✓	✓	3
MWCNT/G-B	✓	-	✓	✓	✓	3
MWCNT/G-B	-	✓	✓	✓	✓	3
MgFe_2O_4	✓	-	✓	✓	✓	3
MgFe_2O_4	-	✓	✓	✓	✓	3
$\text{MgFe}_2\text{O}_4/\text{G-B}$	✓	-	✓	✓	✓	3
$\text{MgFe}_2\text{O}_4/\text{G-B}$	-	✓	✓	✓	✓	3
TOTAL	✓	✓	-	-	-	28

Nota: G-B= Glicina-betaína; MWCNT= Nanotubos de carbono de pared múltiple, MgFe_2O_4 = Ferrita de magnesio.

6.1. Análisis estadístico

- Los resultados de supervivencia y velocidad de germinación se hicieron en dos etapas, la primera etapa se realizó un análisis por corte a las 42, 54 y 68 horas. Y en la segunda etapa fue realizado un análisis de supervivencia, adaptado a la

germinación con distribución binomial, obteniendo ChiSquare X^2 con los paquetes estadísticos JMP, graficado con GraphPad Prisma 8.0.1. Para evaluar el efecto de los factores, se realizó un análisis estadístico Splus 2000.

- Los resultados de las variables de peso fresco, peso seco fueron sometidos para su análisis a un análisis de vaianza yuna prueba de Fisher (LSD) con $p \leq 0.05$, $n=20$ p en el software SPLUS 2000.
- Los resultados de las tinciones fueron realizados por medio de un análisis de varianza en el software Statistics, realizando una prueba de Fisher (LSD), se usó GraphPad Prisma 8.0.1 para la representación gráfica.

7. RESULTADOS

Para la caracterización de los MWCNT, se analizaron mediante espectroscopía Raman y microscopía electrónica de transmisión. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7. El espectro Raman muestra dos de las bandas características de los MWCNT, donde la banda ID corresponde. La banda G se observó a 1578 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones tangenciales de los átomos de carbono, que surge del modo E_{2g} del plano del grafito, mostrando la presencia de hibridación electrónica sp^2 del carbono. Mientras tanto, la banda D en 1358 cm^{-1} generada por trastornos estructurales en los materiales grafitizados, correspondientes a los enlaces sp^3 de las distorsiones de la red en las láminas curvas de grafeno y extremos de los nanotubos de carbono (Figura 7A). Por otro lado, se muestra en la figura 7B, la micrografía obtenida por TEM, donde se observan las distintas capas que constituyen la estructura del nanotubo, en algunos casos con una mayor o menor cantidad de capas estructurales, así como diámetros también variables.

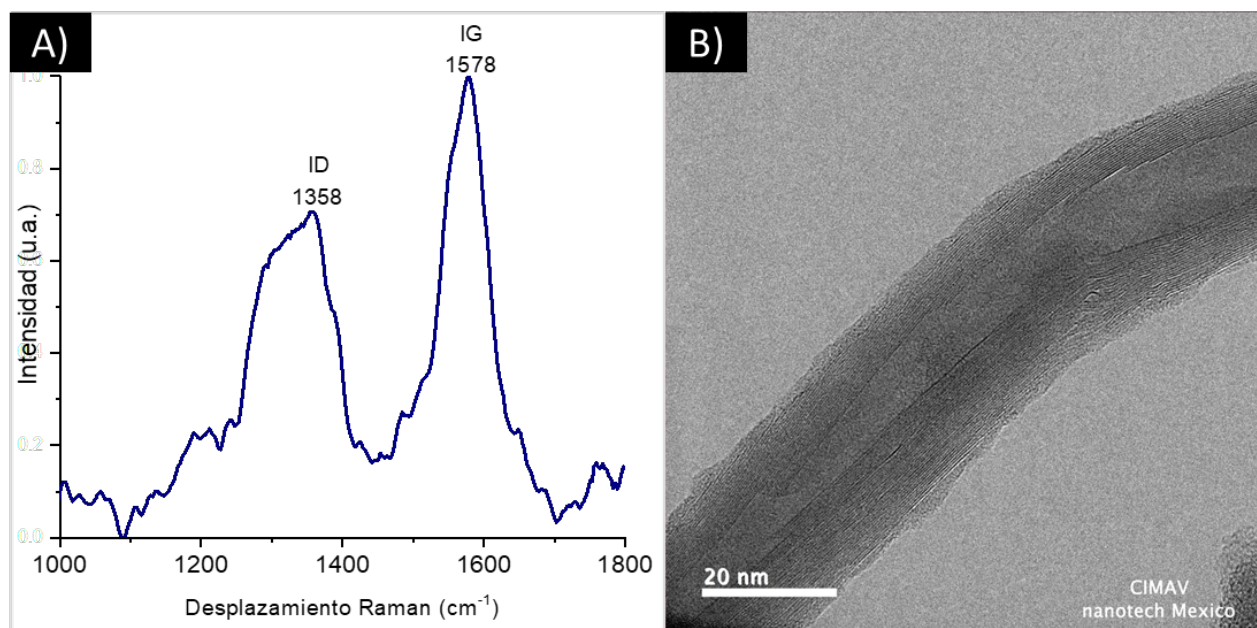


Figura 7 Caracterización de los MWCNT: A) Espectro Raman y B) micrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión.

Asimismo, se analizaron las ferritas de magnesio para identificar sus principales características morfológicas. En la figura 8 se muestran las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido tomadas a distintas amplitudes. En estas imágenes puede apreciarse un grado importante de aglomeración de estas nanopartículas, así como una variabilidad estructural y de tamaño de estos nanomateriales.

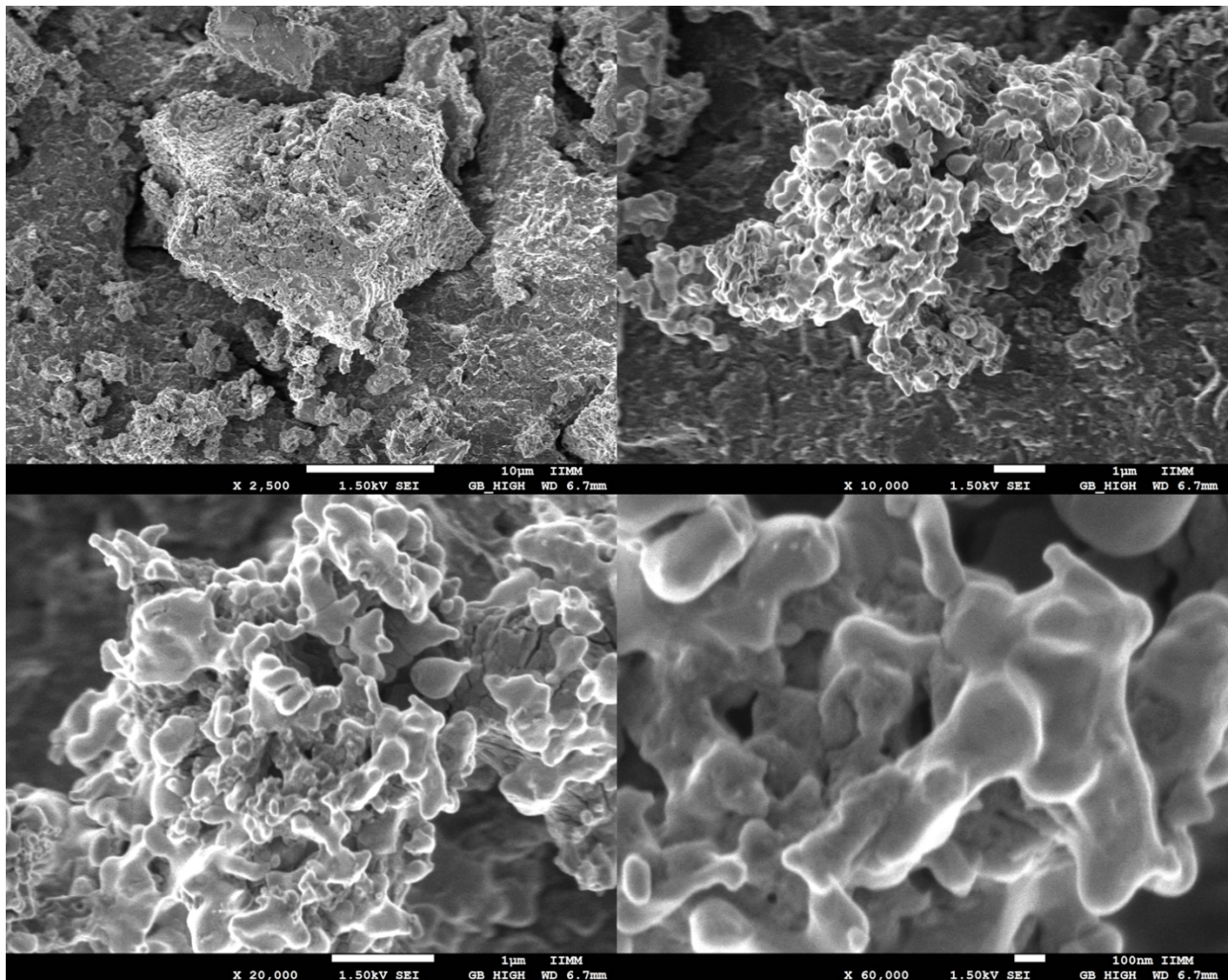


Figura 8 Micrografías de nanopartículas de ferritas de magnesio dopadas con magnesio, obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

Asimismo, se evaluó el tamaño de poro de las nanopartículas de magnesio, así como su área de superficie. El análisis mostró que las ferritas utilizadas presentan un área de superficie de $12.72 \text{ m}^2/\text{g}$, mientras que el tamaño de poro fue de 4.13 nm de radio (figura 9).

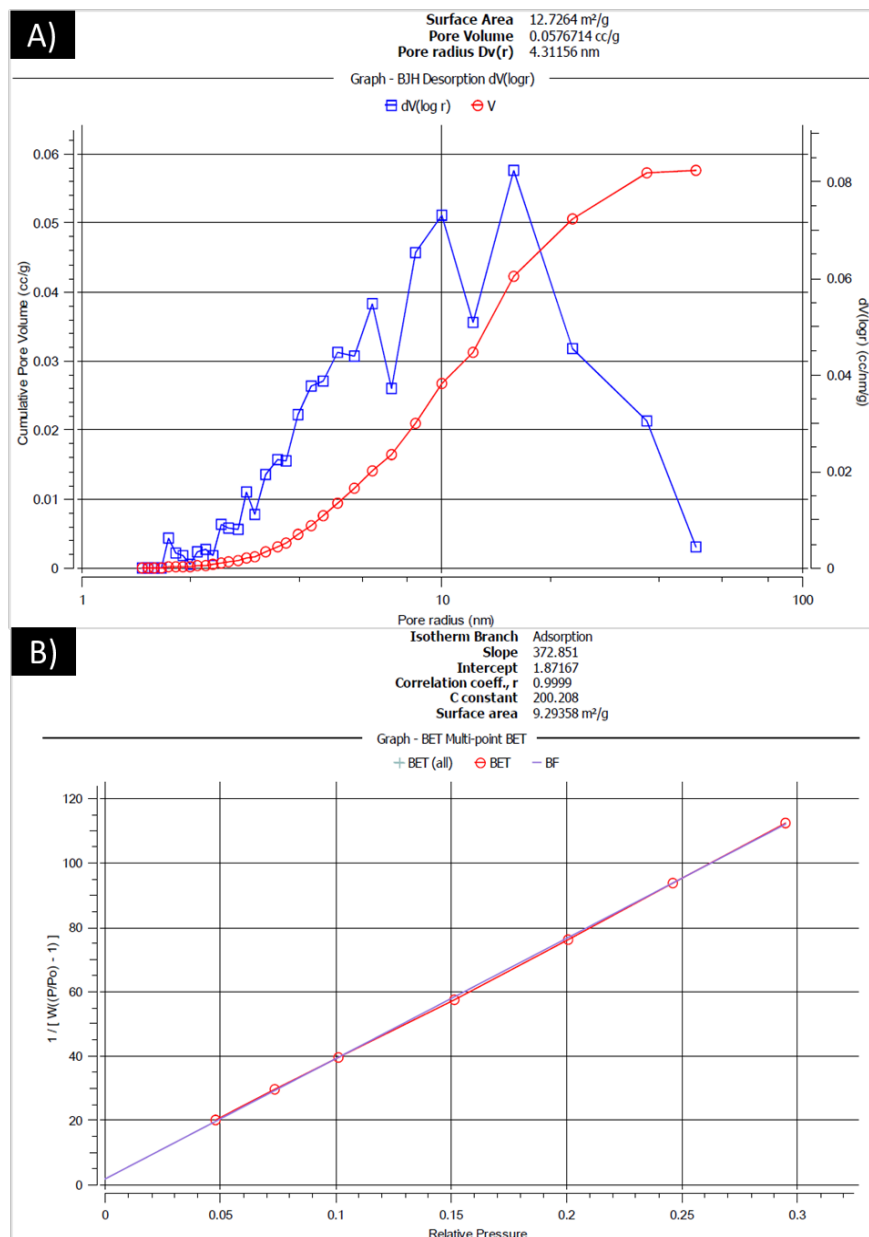


Figura 9 Área superficial específica y tamaño de poro de nanopartículas de ferritas de magnesio dopadas con magnesio.

Para evaluar los efectos de estas nanopartículas en interacción con Glicina-Betaína sobre la semilla de maíz cultivada con y sin déficit hídrico en bioensayos *in vitro* dosis respuesta, se aplicaron 5, 10 o 20 µg/ml de cada una de las nanopartículas probadas. Después de la siembra de la semilla se analizaron los datos de la germinación temprana de maíz, durante las primeras horas después de la siembra, separando las condiciones a las que se sometieron las semillas en un estado de estrés hídrico y otra sin estrés hídrico, para obtener las variables respuesta establecidas en tres intervalos de tiempo.

7.1. FASE I

El proyecto de investigación se dividió en dos fases: durante la primera fase se realizó un cebado previo a la siembra de la semilla de maíz con las 5, 10 y 20 µg/ml de MWCNT o con nanopartículas de MgFe_2O_4 con interacción de glicina-betaína en condiciones de estrés y sin estrés hídrico.

7.1.1. Evaluación de los efectos de los MWCNT y la interacción MWCNT/G-B sobre la semilla de maíz en condiciones de déficit hídrico

7.1.1.1. Germinación de semilla de maíz con MWCNT o la interacción MWCNT/Glicina-betaína en condiciones de déficit hídrico

Los resultados obtenidos sobre la germinación de maíz se muestran en las figuras 10, 11, y 12. En la figura 10 se muestran imágenes representativas de la germinación de esta semilla suplementada con 5, 10 y 20 µg/ml de MWCNT o MWCNT en interacción con glicina- betaína durante las primeras 42 h después de la siembra de maíz. En la figura 10A observamos el efecto de estos tratamientos cuando las semillas no se sometieron a estrés hídrico y en la figura 10B, se muestra la germinación de las semillas cuando estuvieron expuestas a déficit hídrico.

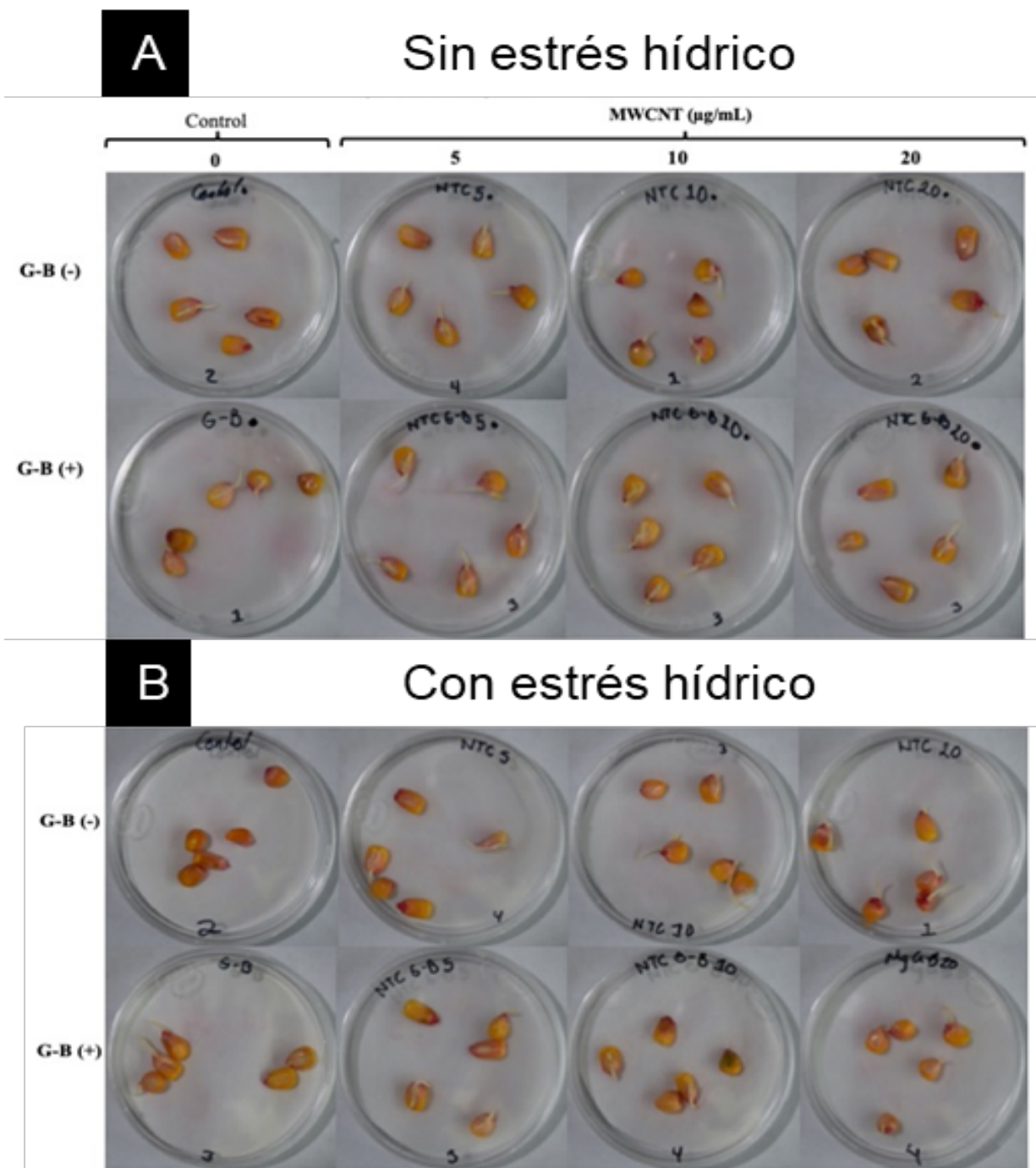


Figura 10 Germinación de maíz cultivado con MWCNT en concentraciones de 0, 5, 10 y 20 ($\mu\text{g/mL}$) con y sin glicina-betaína a las 42 h después de la siembra, para A) sin estrés hídrico y B) bajo estrés hídrico.

Nota: G-B (+) = Glicina-betaína; G-B (-) = Sin glicina-betaína.

En la figura 11A se muestran imágenes representativas de la germinación del maíz suplementada con 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT sin estar expuestas a estrés hídrico y en la figura 11B al exponerlas en condiciones de estrés hídrico 54 h.

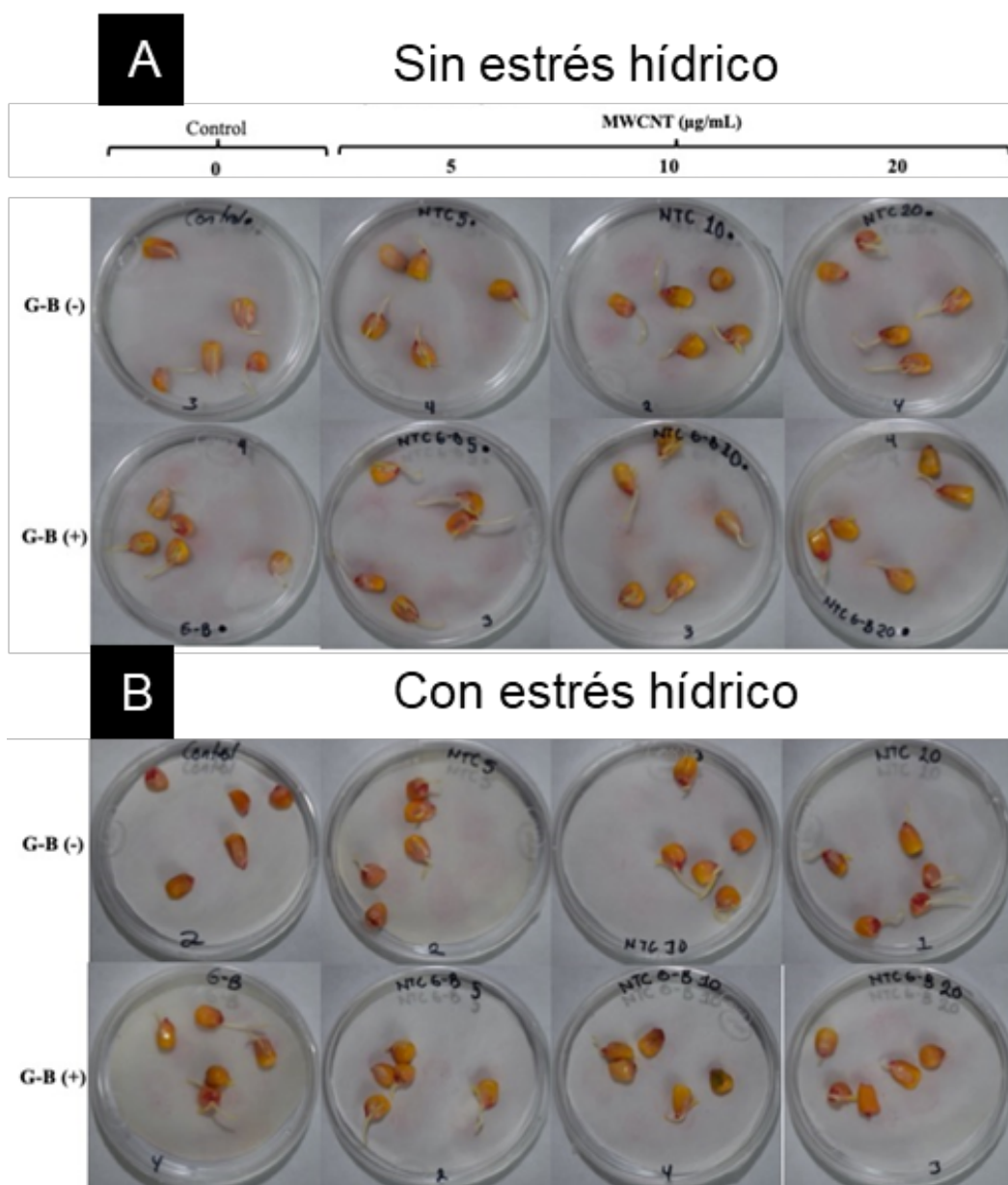


Figura 11 Germinación de maíz cultivado con MWCNT en concentraciones de 0, 5, 10 y 20 ($\mu\text{g/ml}$) y su interacción con glicina-betaína en condiciones de estrés hídrico a las 54 h después de la siembra; A) sin estrés hídrico y B) bajo estrés hídrico.

Nota: G-B (+) = Glicina-betaína; G-B (-) = Sin glicina-betaína.

En la figura 12A se muestran imágenes representativas del maíz suplementada con diferentes concentraciones MWCNT sin estrés hídrico y con estrés hídrico 68 h después de la siembra.

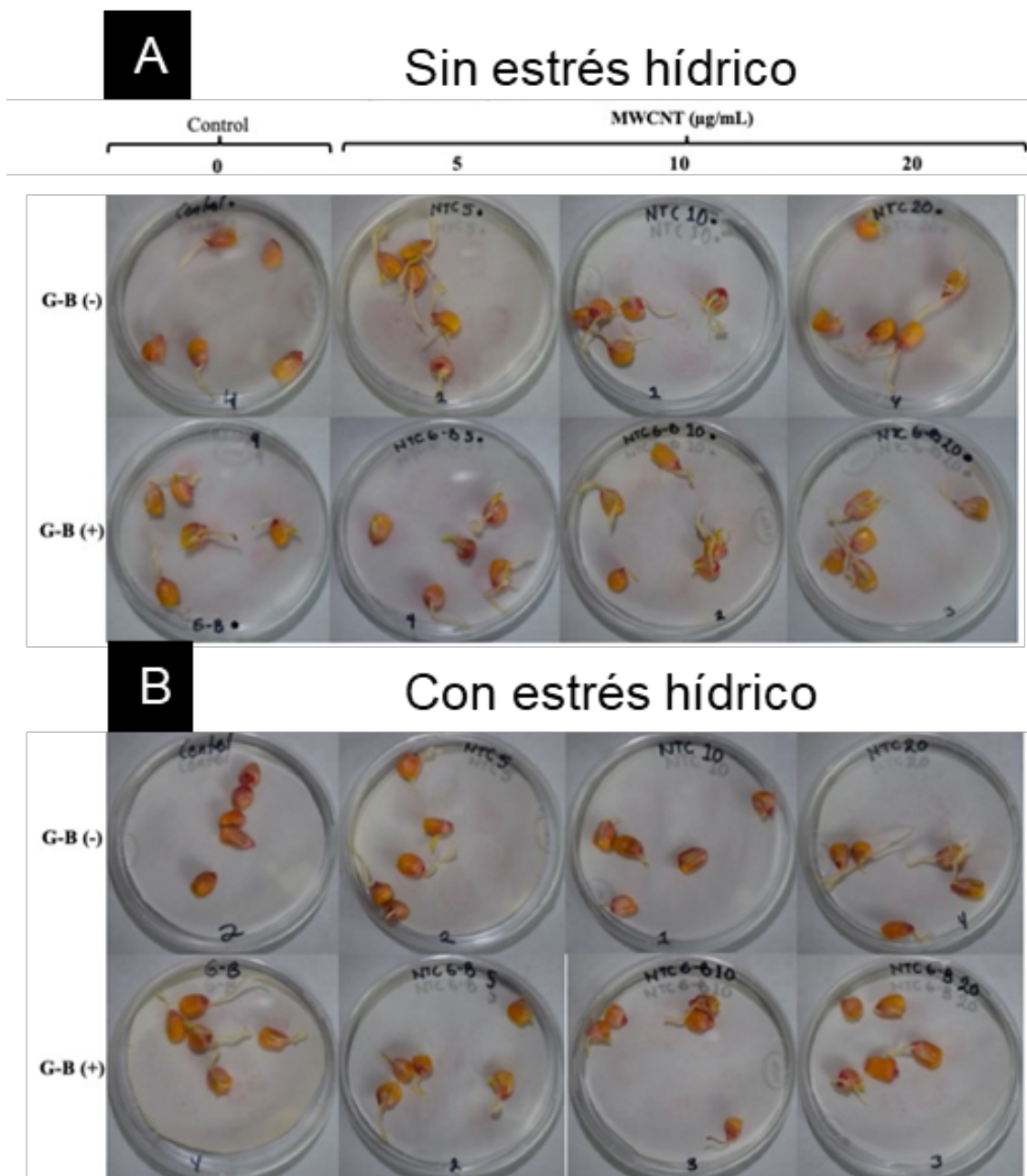


Figura 12 Germinación de maíz cultivado con MWCNT en concentraciones de 0, 5, 10 y 20 ($\mu\text{g/mL}$) con y sin glicina-betaína a las 68 h después de la siembra, para A) sin estrés hídrico y B) bajo estrés hídrico.

Nota: G-B (+) = Glicina-betaína; G-B (-) = Sin glicina-betaína.

Por otro lado, en la tabla 3, se muestra el análisis cuantitativo de la velocidad y porcentaje de germinación de la semilla de esta gramínea con los distintos tratamientos y expuestas a las condiciones de déficit hídrico y sin estrés hídrico. Los resultados mostraron que en las semillas cultivadas sin estrés hídrico suplementadas con 5 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT con y sin glicina-betaína favorecieron la germinación de la semilla, alcanzando un 90% desde las primeras 48 h, seguido de los demás tratamientos donde también se muestra mayor germinación en las primeras horas después de la siembra con porcentajes del 65 y 70 %, superior al 60 % que se obtuvo en las semillas control a las 42 h, a excepción de los tratamientos con 10 y 20 MWCNT, donde tanto la velocidad como el porcentaje de germinación se vio afectado bajo condiciones de estrés hídrico. Por otro lado, al someter las semillas a déficit hídrico, se pudo observar que en todos los tratamientos la velocidad y porcentaje de germinación de la semilla fue mucho mayor que la semilla control, que alcanzó un máximo de 20% a las 68h. Se pudo observar que, en contraste con las semillas sin estrés hídrico, la adición de MWCNT en 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ contrarrestaron el efecto negativo del déficit hídrico, y estimularon la germinación, induciendo hasta un 90% de germinación desde las primeras 42 h, mientras que la interacción MWCNT-GB, también favoreció la germinación comparada con el control, obteniéndose porcentajes de 70 a 90% a las 68 h después de la siembra de las semillas. En relación con la adición de glicina-betaína, se pudo observar que su aplicación de forma individual, es decir, sin MWCNT, favorece la germinación en condiciones de estrés hídrico, pero no hay un efecto sinérgico favorable al aplicarse de forma combinada.

Tabla 3 Porcentaje de germinación de semillas de maíz suplementadas con MWCNT en interacción con Glicina-betaína con y sin estrés hídrico.

Germinación de la semilla de maíz (%)						
	Tratamientos	MWCNT (µg/ml)	Horas después de la siembra			
			0	42	54	68
Sin estrés hídrico	Control (-) Stress	0	0	65±12.6	65±12.6	75±9.6
	Glicina-Betaína	0	0	65±12.6	65±12.6	70±10
	MWCNT	5	0	55±19	60±14.2	65±17
		10	0	75±12.6	75±12.6	95±5
		20	0	60±8.2	70±10	75±9.6
	MWCNT/Glicina-Betaína	5	0	90±10	90±10	90±10
		10	0	90±5.8	90±5.7	90±5.8
		20	0	70±26	80±8.2	80±8.2
Con estrés hídrico	Control Stress	0	0	15±9.6	20±8.2	20±8.2
	Glicina-Betaína	0	0	85±5*	90±5.8*	95±5*
	MWCNT	5	0	70±10*	80±8.2*	95±5*
		10	0	70±13*	70±13*	85±9.6*
		20	0	90±10*	95±5*	95±5*
	MWCNT/Glicina-Betaína	5	0	80±0*	85±5*	95±5*
		10	0	50±20	50±10	60±8.2*
		20	0	65±9.6*	75±5*	75±5*

NOTA: Los datos fueron procesados con un análisis de supervivencia adaptado a la germinación con una distribución binomial $n=5$ y $p \leq 0.05$. Para evaluar la velocidad de germinación se utilizó ANOVA de una vía. En una columna, el valor con un asterisco representa diferencias significativas.

Los resultados del análisis que fueron examinados en la fase I, correspondiente a la condición sin estrés hídrico por porcentaje de germinación con $X^2 = 11.29$, G.L.=7, $P < 0.13$ y una velocidad de germinación $F = 1.58$, G.L.=7, $P = 0.15$. Por otro lado, en condiciones de estrés hídrico en porcentaje de germinación con $X^2 = 42.45$, G.L.=7, $P < 0.0001^*$ y una velocidad de germinación $F = 16$, G.L.=7, $P = 0.0001^*$ mostrando una diferencia altamente significativa en el porcentaje y velocidad de germinación.

7.1.1.2. Biomasa de semillas de maíz suplementadas con MWCNT con y sin interacción con glicina betaína

En la figura 13, se muestran los resultados de la biomasa de las semillas de maíz suplementadas con los distintos tratamientos después de 24h del cebado con 5, 10 o 20 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT y MWCNT con Glicina–Betaína en condiciones de estrés hídrico y sin estrés hídrico. Los resultados obtenidos mostraron que ninguno de los tratamientos mostró diferencia significativa con respecto de las semillas control, independientemente de la condición de estrés hídrico o de los tratamientos.

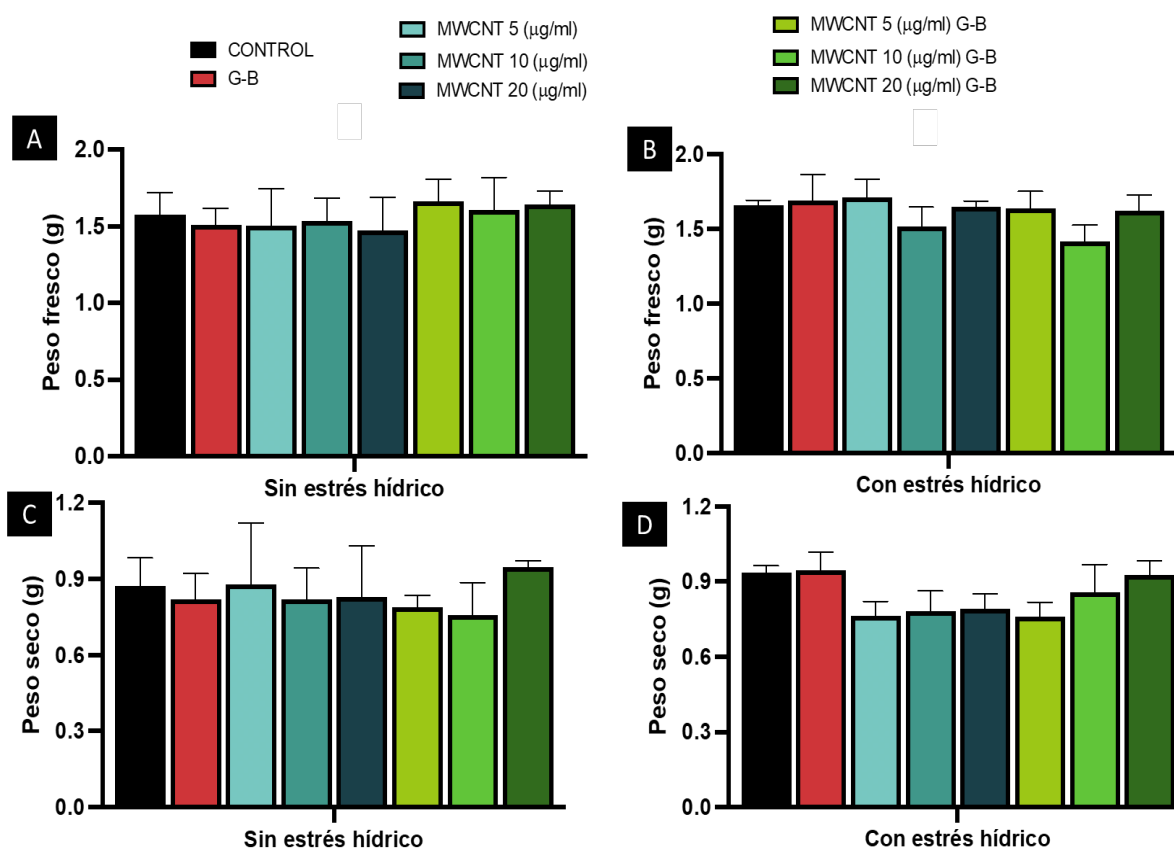


Figura 13 Biomasa de las semillas de maíz suplementadas con 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de nanotubos de carbono con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés.

Los resultados fueron analizados con Fisher (LSD) con $p \leq 0.05$, $n=20$, la barra representa el error estándar.

7.1.1.3. Determinación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en semillas de maíz suplementadas con MWCNT o MWCNT/G-B en condiciones de estrés hídrico.

Para evaluar los efectos de las nanopartículas y su interacción con glicina-betaina sobre la semilla de maíz expuesta a condiciones de estrés hídrico, sobre la producción de ROS, se analizó la producción de H_2O_2 en las semillas (Figura 14). En la figura 14A, se muestran imágenes representativas de la tinción para la detección de H_2O_2 . Asimismo, en la figura 14B se muestra el análisis cuantitativo de H_2O_2 , donde se observa que el tratamiento con nanotubos de carbono en concentración 10 $\mu\text{g/ml}$ cultivados sin estrés hídrico, tuvo una mayor producción de H_2O_2 , significativamente mayor con respecto a los demás tratamientos y las semillas del control. Las demás concentraciones de NTC independientemente de la presencia de las ferritas no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, al estar las semillas en condiciones de déficit hídrico, pudimos observar que además del tratamiento con 10 $\mu\text{g/ml}$ de nanotubos de carbono, también el tratamiento donde se suplementó la betaína individualmente se generó una mayor producción de H_2O_2 , en contraste, al suplementar 20 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT la cantidad de peróxido de hidrógeno se redujo significativamente, comparado con el control y los demás tratamientos (Figura 14B).

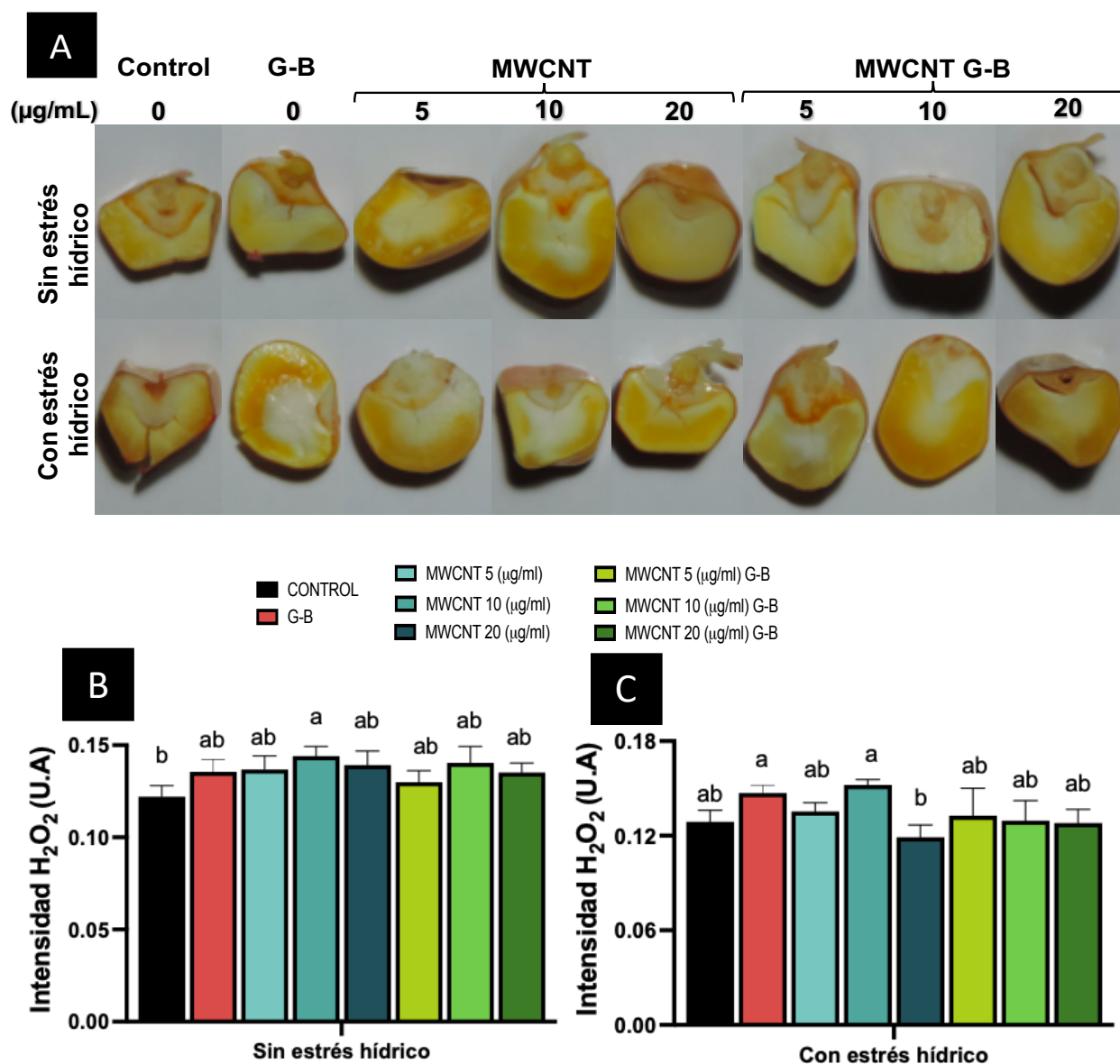


Figura 14 Peróxido de hidrógeno en semillas de maíz suplementados con 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de nanotubos de carbono con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés. A) Imágenes representativas de las semillas de maíz teñidas con (DAB) para detección de H_2O_2 ; B) Cuantificación de H_2O_2 en semilla de maíz sin déficit hídrico; C) Cuantificación de H_2O_2 en semilla de maíz con déficit hídrico.

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía / Fisher (LSD). Con valor de $F=1.01$, G. L=7 $P=0.44$ para A) y $F=1.23$, G. L=7, $P=0.29$ para B), se utilizó una $n=6$ y 4 réplicas. La barra indica error estándar.

7.1.1.4. Determinación de deshidrogenasas en semillas de maíz suplementadas con MWCNT o la interacción MWCNT/G-B en condiciones de déficit hídrico

Se evaluaron los efectos de las nanopartículas y su interacción con glicina-betaína sobre la síntesis de deshidrogenasas en semilla de maíz expuesta a condiciones de estrés hídrico, mediante detección histoquímica con TTC al 0,1% (p/v). Los resultados se muestran en la figura 15. Se muestran imágenes representativas de las semillas teñidas con TTC en la figura 15A. Asimismo, en la figura 15B se muestra los resultados obtenidos de la cuantificación de deshidrogenasas, donde se observó que la producción de deshidrogenasas en las semillas independientemente de los tratamientos o las condiciones de estrés, no mostraron diferencias significativas con respecto de las semillas control.

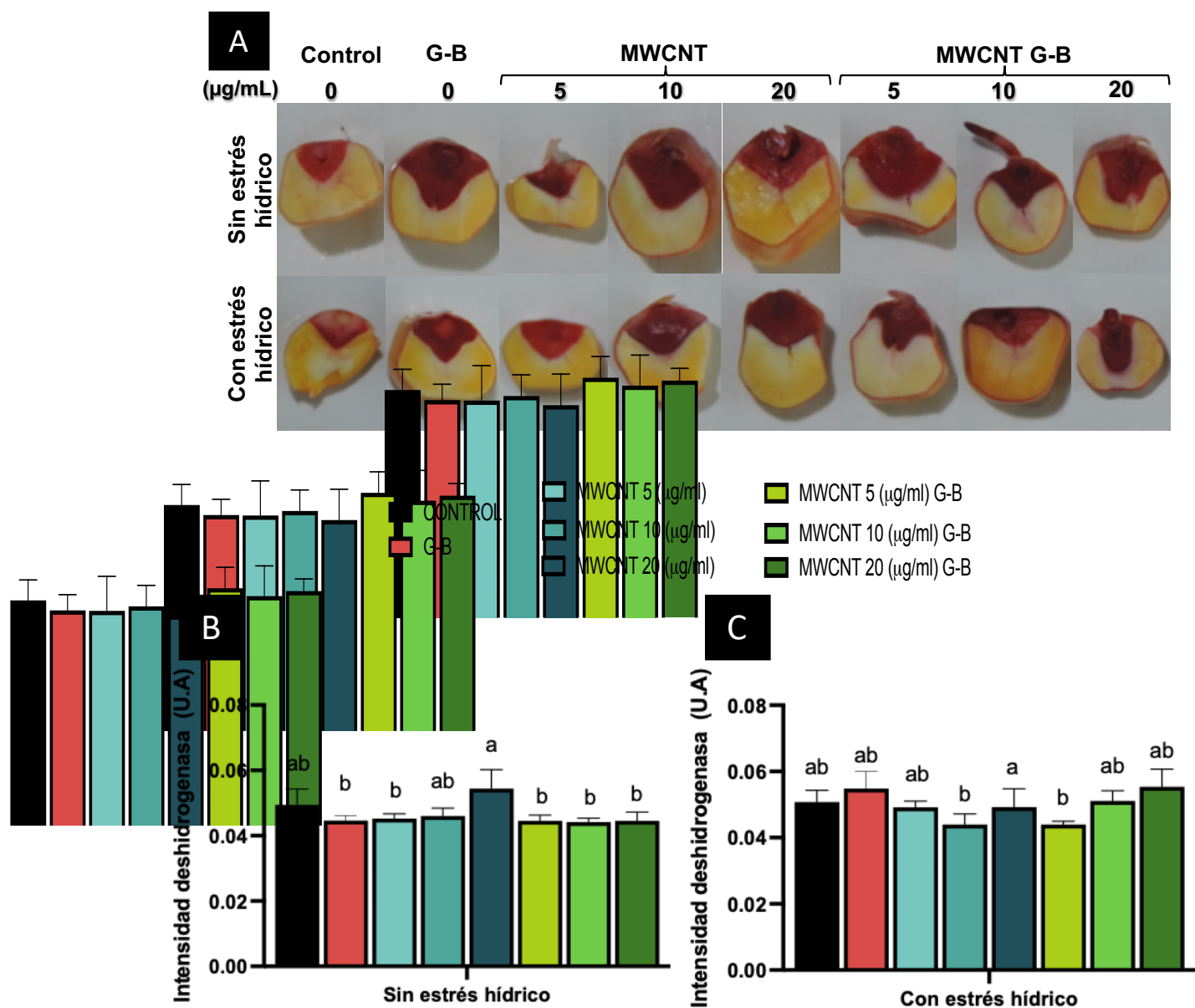


Figura 15 Deshidrogenasas de la semilla de maíz suplementadas con 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de nanotubos de carbono con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés; A) Imágenes representativas de las semillas de maíz teñidas con TTC para evaluar intensidad de deshidrogenasas; B) Deshidrogenasas en semilla de maíz sin déficit hídrico; C) Deshidrogenasas en semilla de maíz con déficit hídrico.

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía / LSD. Para B) Con un valor de $F=1.2970$, G. L=7 $P=0.2768$ y para C) $F=1.1973$, G. L=7, $P=0.33$. Se utilizó una $n=6$ y 4 réplicas. La barra indica error estándar.

7.1.1.1. Cuantificación histoquímica de superóxidos (O_2^-) en semillas de maíz suplementadas con MWCNT o la sinergia MWCNT/G-B en condiciones de estrés hídrico.

Se evaluaron los efectos de las nanopartículas y su interacción con glicina-betaína sobre la semilla de maíz expuesta a condiciones de estrés hídrico, sobre la síntesis de superóxidos mediante una tinción de nitroblu de tetrazolium (NBT). Los resultados obtenidos se presentan en la figura 16, donde se muestran imágenes representativas de la acumulación de esta ROS en distintas zonas de las semillas (Figura 16A). Asimismo, se muestra el análisis cuantitativo de la producción de O_2^- donde las semillas fueron cultivadas sin estrés hídrico (Figura 16B), los resultados mostraron que en las semillas donde se adicionó la combinación de 20 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT con glicina, se incrementó la formación de O_2^- con respecto de la mayoría de los tratamientos, pero no distinto a las semillas control. Por otro lado, se observó una disminución de la producción de O_2^- en las semillas suplementadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT y al suplementar la glicina-betaína de forma individual. Por otro lado, cuando las semillas se sometieron a estrés hídrico, pudimos observar que la formación de O_2^- en los tratamientos donde se suplementó la glicina betaína sola se redujo, comparado con los tratamientos con 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT, sin embargo, los resultados no mostraron diferencia de las semillas control y los demás tratamientos (Figura 16C).

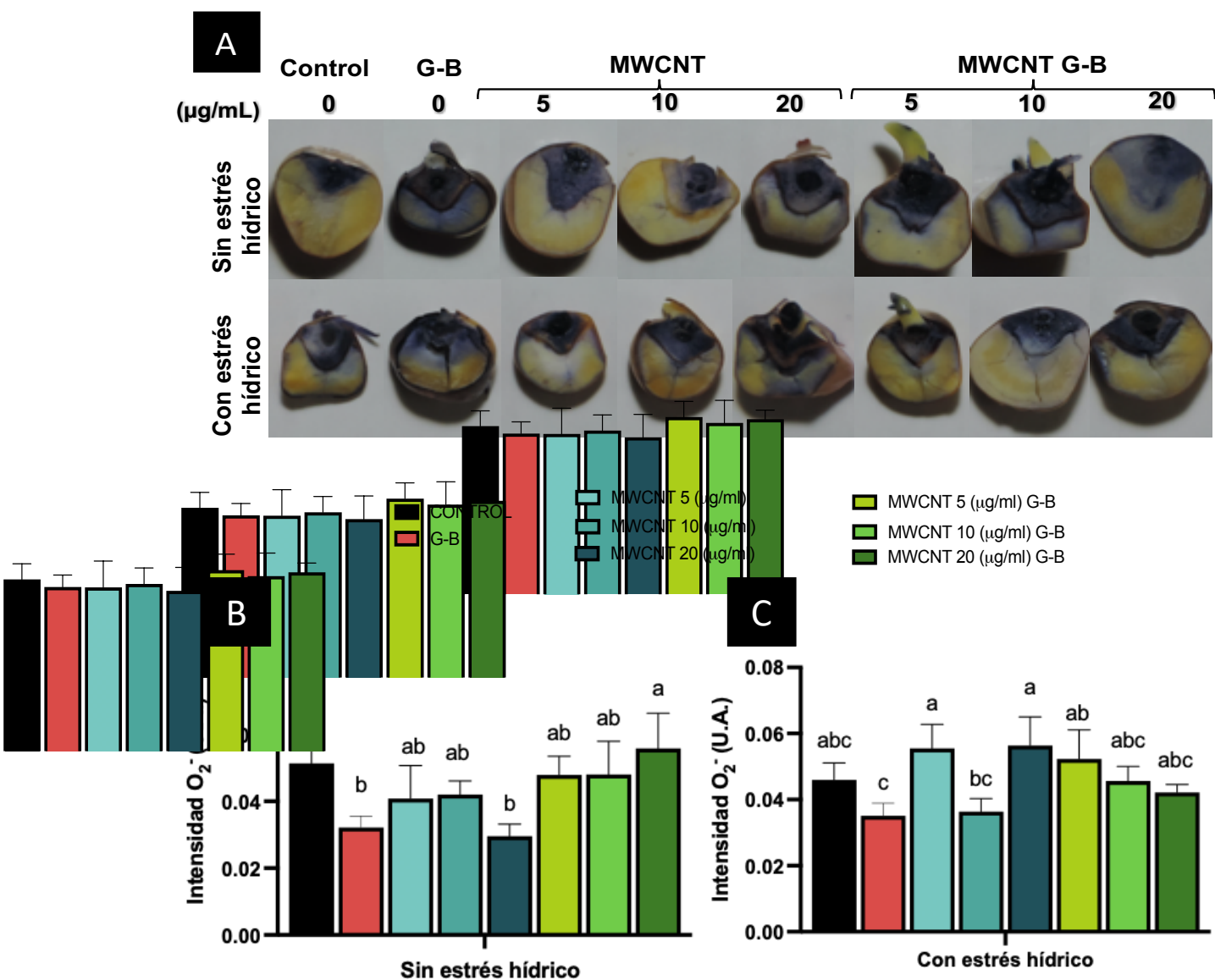


Figura 16 Producción de O_2^- en semillas de maíz suplementados con 0, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de nanotubos de carbono con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés. A) Imágenes representativas de las semillas de maíz teñidas con DAB; B) Cuantificación de O_2^- en semilla de maíz sin déficit hídrico; C) Cuantificación de O_2^- en semilla de maíz con déficit hídrico.

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía / LSD. Para B) Con un valor de $F=1.27$, G. L=7 $P=0.29$ y para C) $F=1.86$, G. L=7, $P=0.1024$. Se utilizó una $n=6$ y 4 réplicas. La barra indica error estándar.

7.1.2. Evaluación de los efectos de las nanopartículas de MgFe_2O_4 y la interacción $\text{MgFe}_2\text{O}_4/\text{G-B}$ sobre las semillas de maíz en condiciones de déficit hídrico.

7.1.2.1. Germinación de semilla de maíz suplementado con MgFe_2O_4 o la interacción $\text{MgFe}_2\text{O}_4/\text{G-B}$ en condiciones de déficit hídrico.

Para evaluar el efecto de las ferritas dopadas con magnesio y su sinergia con glicina betaína sobre la respuesta de las semillas de maíz expuestas a déficit hídrico y en condiciones sin estrés hídrico, se evaluó la velocidad y porcentaje de germinación a las 42, 54 y 68h después de la siembra en bioensayos dosis respuesta. Posteriormente se evaluó el peso fresco y seco de las semillas, por último, se realizaron pruebas histoquímicas que nos dieron información sobre la síntesis de ROS asociadas a la respuesta de estrés en las semillas y plantas. En las figuras 17-20 se muestra imágenes representativas de la germinación de las semillas con los distintos tratamientos en los tres periodos de tiempo evaluados.

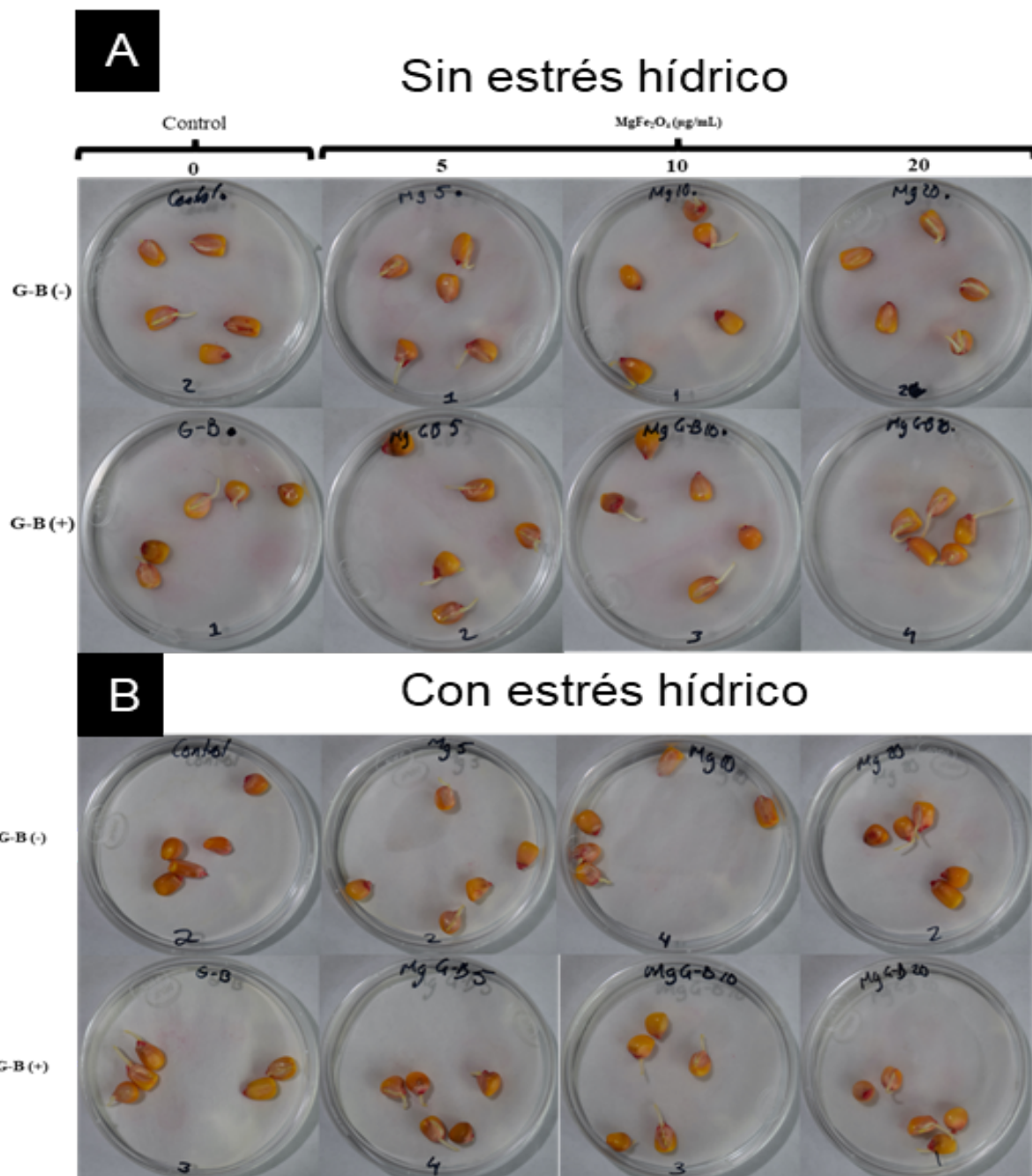


Figura 17 Germinación de la semilla de maíz cultivada con ferrita dopada con magnesio suplementada con 0, 5, 10 y 20 µg/ml con y sin glicina-betaína a las 42 h después de la siembra; A) sin estrés hídrico y B) en condiciones de estrés hídrico.

Nota: G-B (+) = Glicina-betaína; G-B (-) = Sin glicina-betaína

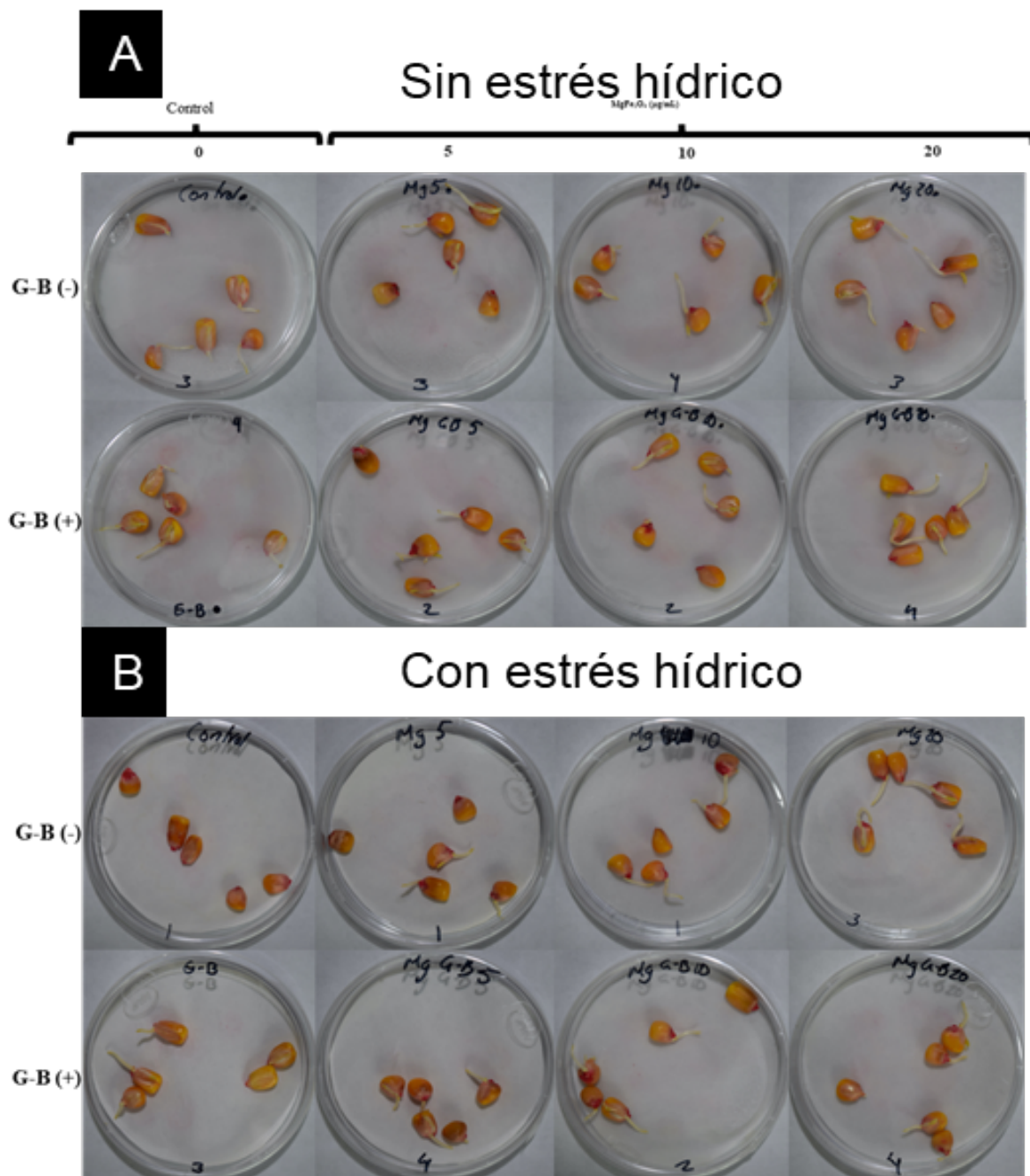


Figura 18 Germinación de la semilla de maíz cultivada con ferrita dopada con magnesio suplementada con 0, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ con y sin glicina-betaína a las 54 h después de la siembra; A) sin estrés hídrico y B) en condiciones de estrés hídrico

Nota: G-B (+) = Glicina-betaína; G-B (-) = Sin glicina-betaína

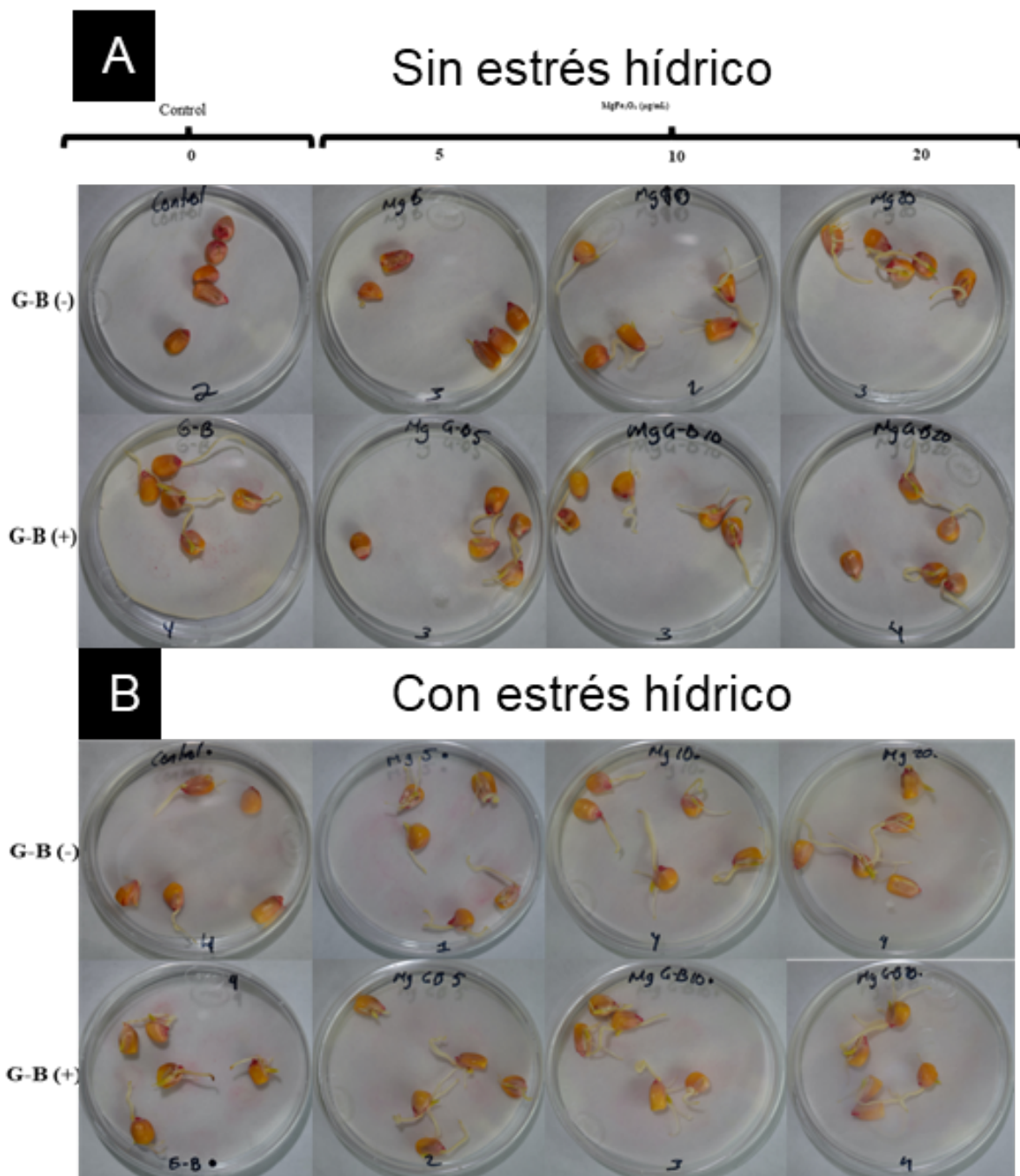


Figura 19 Germinación de la semilla de maíz cultivada con ferrita dopada con magnesio suplementada con 0, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ con y sin glicina-betaína a las 68 h después de la siembra; A) sin estrés hídrico y B) en condiciones de estrés hídrico

Nota: G-B (+) = Glicina-betaína; G-B (-) = Sin glicina-betaína

Por otro lado, en la Tabla 4, se muestra el análisis cuantitativo de la velocidad y porcentaje de germinación de la semilla de esta gramínea con los distintos tratamientos y expuestas a las condiciones de déficit hídrico y sin estrés hídrico. Los resultados mostraron que en las semillas cultivadas sin estrés hídrico no tuvieron mostraron diferencia significativa ni en la velocidad ni el porcentaje de germinación, comparado con las semillas control. Por otra parte, cuando las semillas estuvieron expuestas al déficit hídrico la respuesta cambió, se pudo observar como con la adición de ferritas de magnesio se generó un efecto positivo sobre la velocidad como el porcentaje de germinación, siendo estos superiores al control, queda claro que la aplicación de las NPs de ferrita de magnesio con y sin interacción de glicina-betaína ayudaron a promover la velocidad y el porcentaje de germinación en condiciones de déficit hídrico, cabe señalar que el comportamiento de la glicina-betaína sin ninguna interacción contribuye de forma significativa alcanzando un 90% de germinación desde las primeras 48 h de siembra de la semilla de maíz. El tratamiento que mostró mejores efectos sobre la germinación en condiciones de estrés hídrico fue al suplementar las NPs de MgFe_2O_4 en concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ a las 54 h, con un porcentaje del 85%, comparado con 65 % de las semillas control. Los tratamientos que formaron parte de la interacción con glicina-betaína fueron superiores al control, con porcentajes 75%.

Tabla 4 Porcentaje de germinación de semillas de maíz suplementadas con Ferritas de magnesio en interacción con Glicina-betaína con y sin estrés hídrico.

Germinación de semilla de maíz (%)						
	Tratamientos	MgFe ₂ O ₄ (µg/ml)	Horas después de la siembra			
			0	42	54	68
Sin estrés hídrico	Control (-) estrés	0	0	65±12.6	65±12.5	75±9.6
	Glicina betaína	0	0	65±12.6	65±12.5	70±10
	MgFe ₂ O ₄	5	0	60±8.2	75±5	85±9.6
		10	0	70±5.8	80±8.1	80±8.1
		20	0	65±5	65±5	85±9.6
	MgFe ₂ O ₄ /Glicina betaína	5	0	55±9.6	60±14.1	60±14.1
		10	0	80±0	85±5	85±5
		20	0	80±0	85±5	85±5
	Control (+) estrés	0	0	15±9.6	20±8.2	20±8.1
	Glicina betaína	0	0	85±5*	90±5.8*	95±5*
Con estrés hídrico	MgFe ₂ O ₄	5	0	60±8.1*	65±5*	65±5*
		10	0	70±13*	80±8.1*	80±8.1*
		20	0	60±11.6*	75±9.6*	75±9.6*
	MgFe ₂ O ₄ / Glicina betaína	5	0	75±9.6*	75±9.6*	75±9.6*
		10	0	75±5*	75±5*	75±5*
		20	0	65±5*	70±10*	75±9.6*

Los datos fueron procesados con un análisis de supervivencia adaptado a la germinación con una distribución binomial n=5 y p≤0.05. Para la se evaluó la velocidad de germinación con un análisis de varianza de una vía. En una columna, el valor con un asterisco representa diferencias significativas.

Los resultados del análisis que fueron examinados para la fase I sin condiciones de estrés hídrico por porcentaje de germinación con $X^2=5.33$, G.L.=7, $P=<0.63$ (sin diferencia) y una velocidad de germinación $F=2.15$, G.L.=7, $P=0.04$ (diferencia estadísticamente significativa). Así mismo en condiciones de estrés hídrico el porcentaje de germinación con $X^2=29.26$, G.L.=7, $P=<0.0001^*$ y una velocidad de germinación $F=7.9212$, G.L.=7, $P=0.0001^*$ mostrando una diferencia altamente significativa.

7.1.2.2. Biomasa de semillas de maíz suplementadas con nanopartículas de MgFe_2O_4 o la interacción $\text{MgFe}_2\text{O}_4/\text{G-B}$ en condiciones de déficit hídrico.

Los resultados obtenidos sobre la biomasa de las semillas de maíz cultivadas con y sin déficit hídrico suplementadas con las NPs y su interacción con glicina betaína, no mostraron diferencia significativa entre los distintos tratamientos ni las condiciones de déficit hídrico en el peso fresco (Figuras 20A y 20B), ni tampoco en el peso seco (Figuras 20C y 20D).

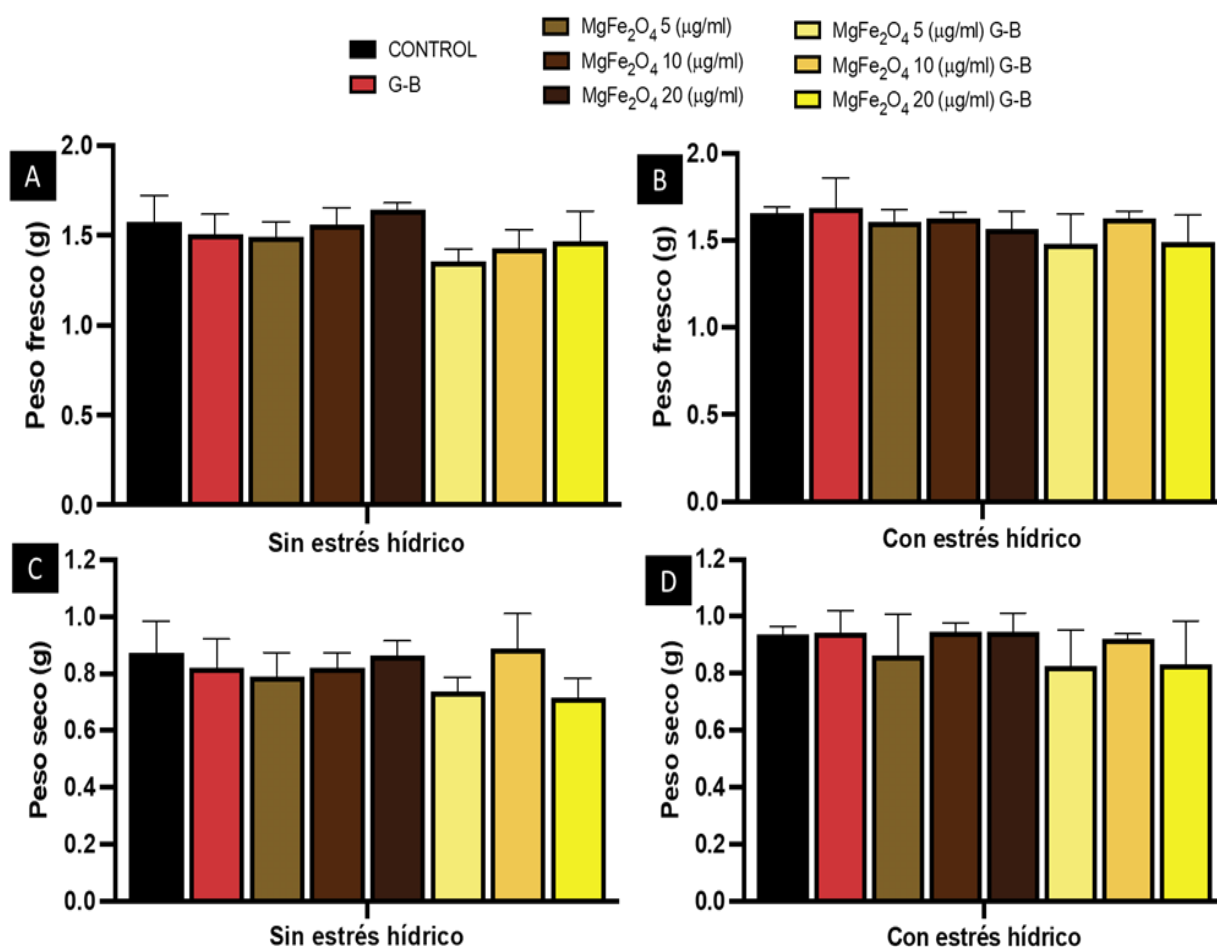


Figura 20 Biomasa de las semillas de maíz suplementadas con 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de nanopartículas de MgFe_2O_4 con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés.

Los resultados fueron analizados con Fisher (LSD) con $p \leq 0.05$, $n=20$, la barra representa el error estándar.

7.1.2.3. Determinación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de en semillas de maíz suplementadas con $MgFe_2O_4$ o $MgFe_2O_4$ -GB en condiciones de déficit hídrico.

Para la localización y cuantificación de H_2O_2 en las semillas se realizó un análisis histoquímico con DAB al 0,1% (p/v). En la figura 21A se muestran imágenes representativas de las semillas de maíz teñidas. Mientras que en la figura 21B se muestra el análisis cuantitativo del H_2O_2 . Los resultados mostraron que el tratamiento con NPs de ferrita de magnesio a 10 $\mu g/ml$ estimuló una mayor producción de H_2O_2 en las semillas que no fueron expuestas a déficit hídrico, en comparación con las semillas suplementadas con los demás tratamientos y con las semillas control. Por otro lado, la formación de este radical libre no se vio alterado en condiciones de déficit hídrico, al no identificarse diferencias significativas entre las semillas con los distintos tratamientos y el control (Figura 21C).

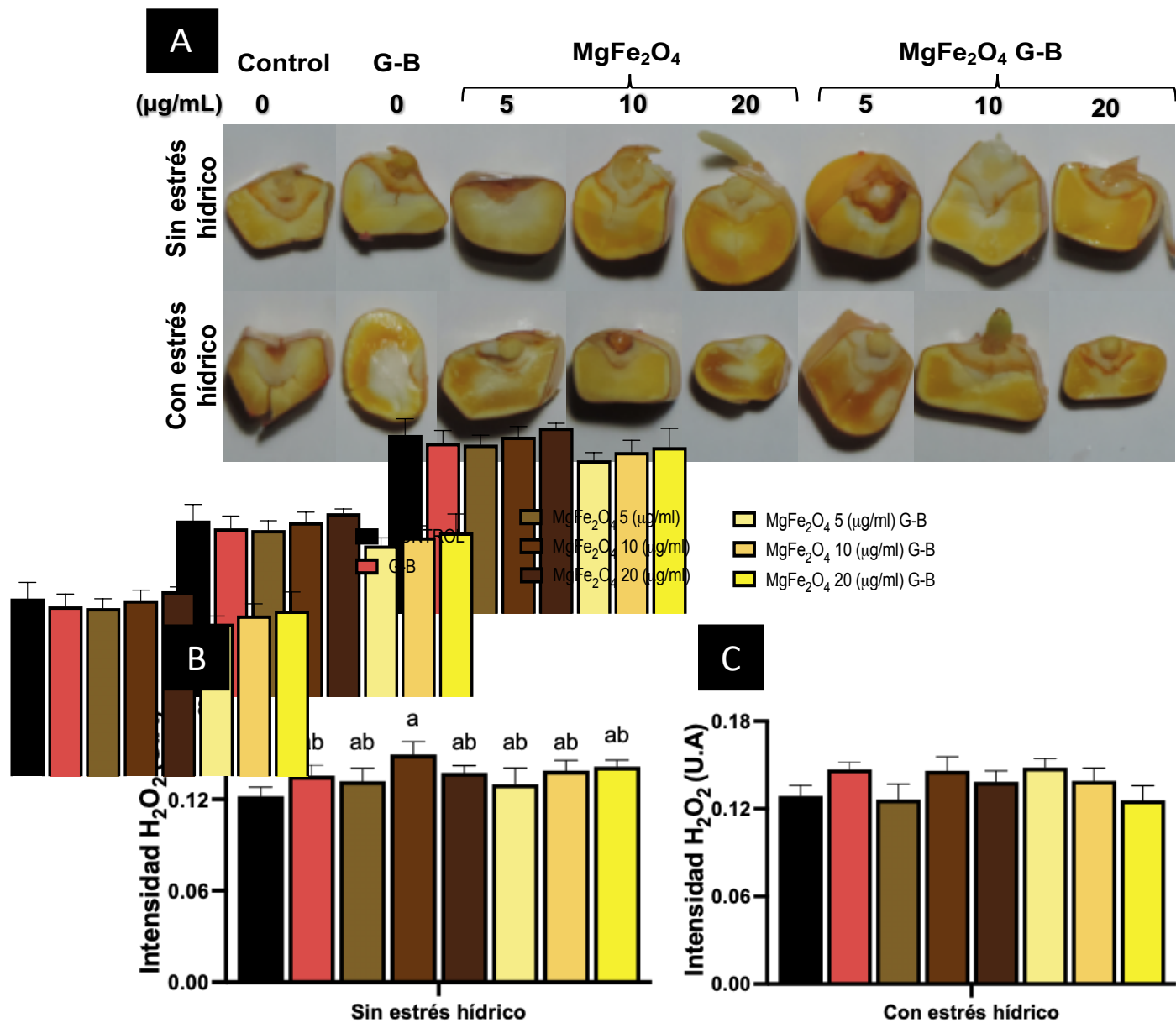


Figura 21 Peróxido de hidrógeno en semillas de maíz suplementados con 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de MgFe_2O_4 con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés. A) Imágenes representativas de las semillas de maíz teñidas con DAB para detección de H_2O_2 ; B) Cuantificación de H_2O_2 en semilla de maíz sin déficit hídrico; C) Cuantificación de H_2O_2 en semilla de maíz con déficit hídrico.

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía / Fisher (LSD). Con valor de $F=1.27$, G. L=7 $P=0.29$ para B) y $F=1.26$, G. L=7, $P=0.29$ para C), Se utilizó una $n=6$ y 4 réplicas. La barra indica error estándar.

7.1.2.4. Determinación de deshidrogenasas en semillas de maíz suplementadas con MgFe_2O_4 o la interacción MgFe_2O_4 /G-B en condiciones de déficit hídrico

Para la localización y cuantificación de H_2O_2 en las semillas se realizó un análisis histoquímico con TTC al 0,1% (p/v). En la figura 22A se muestran imágenes representativas de las semillas teñidas con TTC para detección de deshidrogenasas. Mientras que en la figura 22B se muestra el análisis cuantitativo de las deshidrogenasas en semillas sin exposición a déficit hídrico. Los resultados obtenidos mostraron que al adicionar 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de NPs de MgFe_2O_4 se incrementó significativamente la formación de H_2O_2 comparado con las semillas control, sin embargo, los demás tratamientos no mostraron diferencias. Asimismo, se observó que en condiciones de déficit hídrico la formación de H_2O_2 fue similar en todos los tratamientos y en las semillas control (figura 22C).

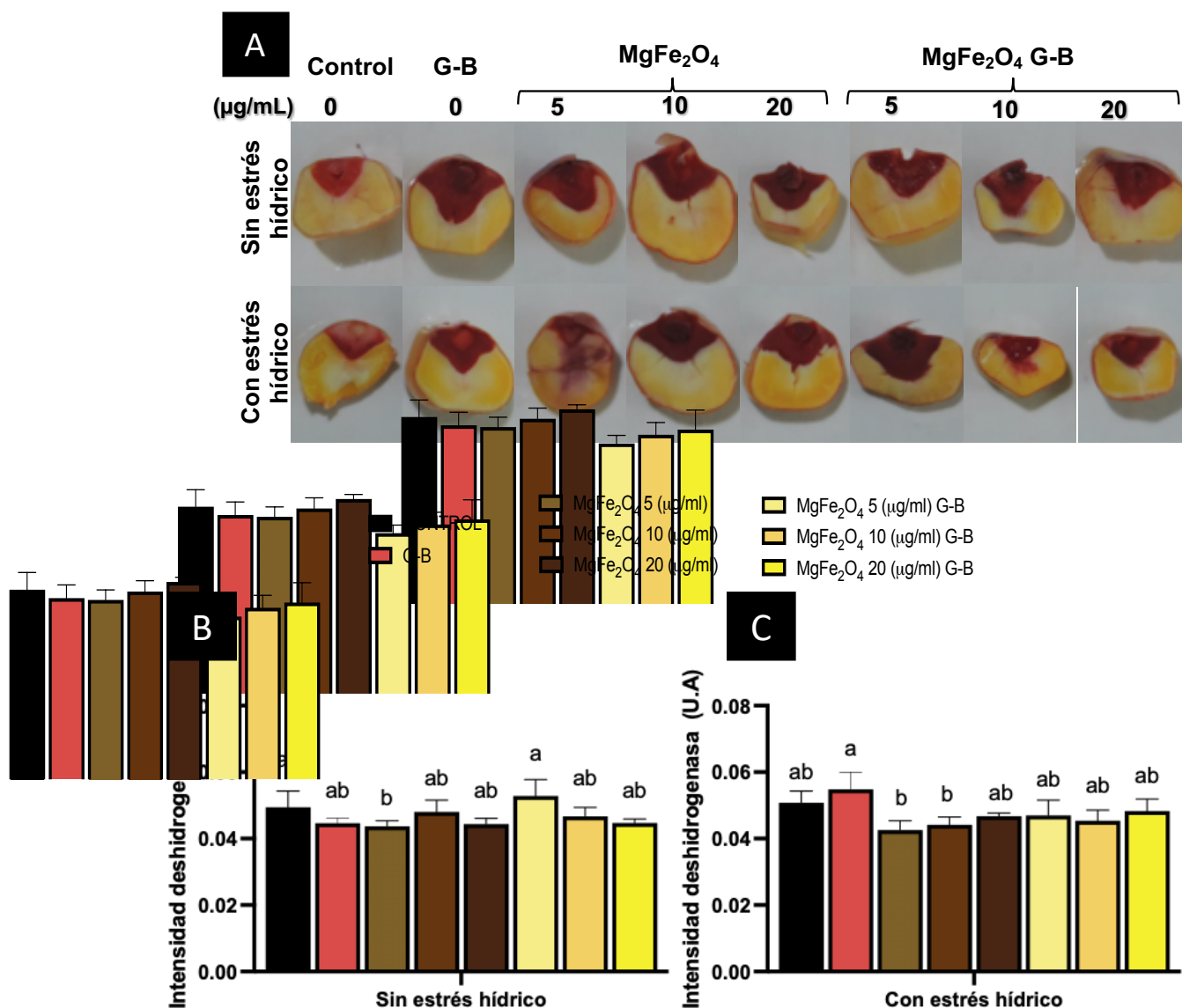


Figura 22 Intensidad de deshidrogenasas de la semilla de maíz suplementadas con 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de MgFe_2O_4 con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés; A) Imágenes representativas de las semillas de maíz teñidas con TTC; B) Intensidad de deshidrogenasas en semilla de maíz sin déficit hídrico; C) Intensidad de deshidrogenasas en semilla de maíz con déficit hídrico.

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía / LSD. Para B) Con un valor de $F=1.031$, G. L=7 $P=0.4251$ y para C) $F=1.25$, G. L=7, $P=0.3$ Se utilizó una $n=6$ y 4 réplicas. La barra indica error estándar.

7.1.2.5. Cuantificación histoquímica de superóxidos (O_2^-) en semillas de maíz suplementadas con $MgFe_2O_4$ o la interacción $MgFe_2O_4$ /G-B en condiciones de déficit hídrico

Determinación y cuantificación de superóxidos de la semilla de maíz con y sin exposición a estrés hídrico en bioensayos dosis respuesta con $MgFe_2O_4$ y/o glicina-betaína. La tinción realizada para la cuantificación de deshidrogenasas se llevó a cabo mediante solución de nitroblu de tetrazolium. En la figura 23A se muestran las imágenes representativas de las semillas teñidas con NBT. Por otro lado, en la figura 23B se muestran los resultados de la determinación de O_2^- en las semillas sin exposición al déficit hídrico, donde se observó que al suplementar 20 $\mu g/ml$ de $MgFe_2O_4$ la cantidad de O_2^- se incrementó significativamente, contrario a lo que se observó al suplementar la glicina-betaína de forma individual o con 5 $\mu g/ml$ de $MgFe_2O_4$ en sinergia con glicina-betaína, donde la síntesis de O_2^- se redujo significativamente. Por otro lado, en las semillas expuestas a déficit hídrico, mostraron que al adicionar 20 $\mu g/ml$ de $MgFe_2O_4$ combinado con glicina-betaína incrementó la formación de O_2^- , y con 5 $\mu g/ml$ de $MgFe_2O_4$ o 20 $\mu g/ml$ de $MgFe_2O_4$ con glicina-betaína pasó el efecto contrario, al disminuirse la cantidad de O_2^- en las semillas (Figura 23C).

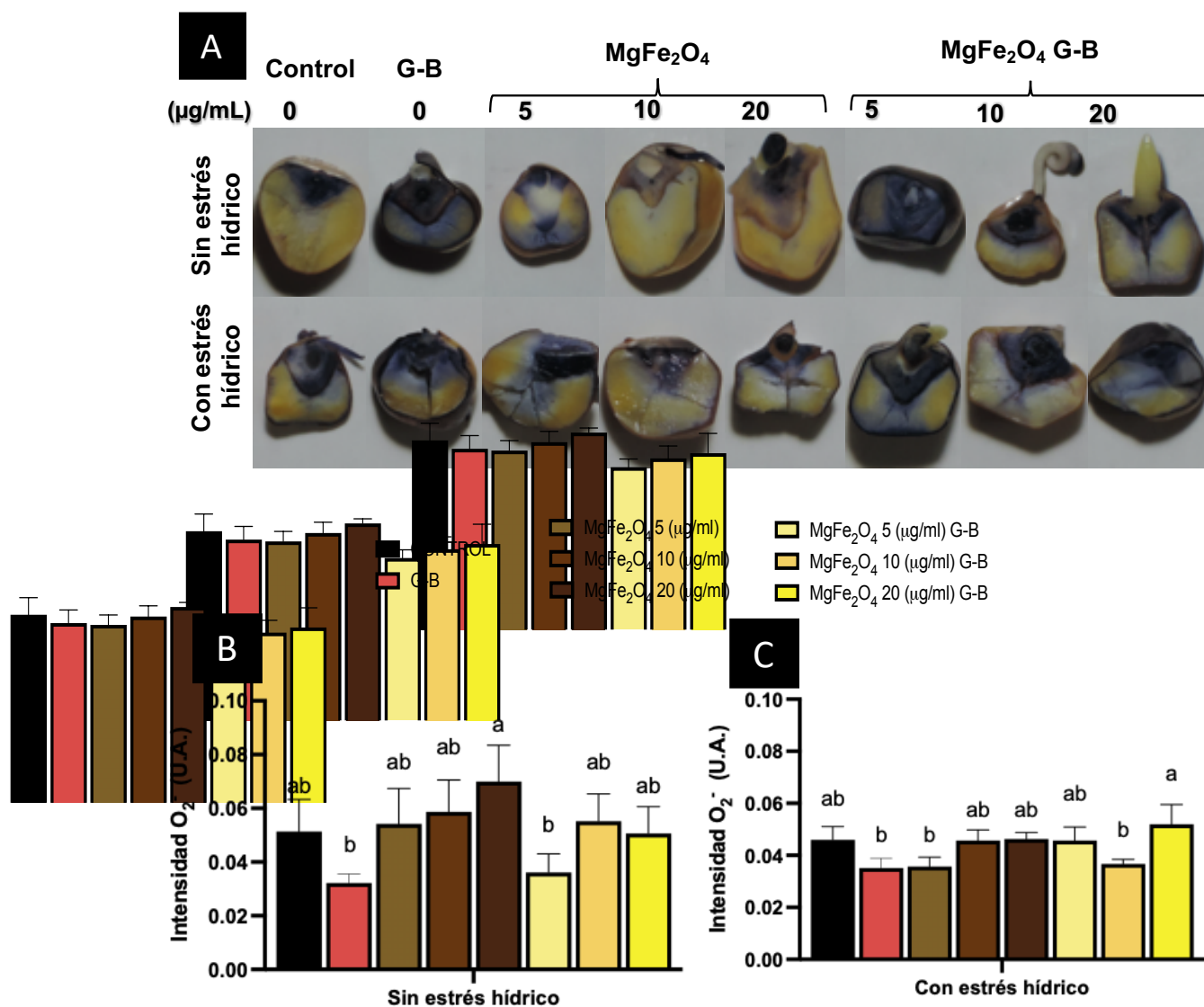


Figura 23 Producción de O₂⁻ en semillas de maíz suplementados con 0, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de nanotubos de MgFe₂O₄ con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés. A) Imágenes representativas de las semillas de maíz teñidas con NBT; B) Cuantificación de O₂⁻ en semilla de maíz sin déficit hídrico; C) Cuantificación de O₂⁻ en semilla de maíz con déficit hídrico.

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía / LSD. Para B) Con un valor de $F=1.29$, G. L=7 $P=0.28$ y para C) $F=1.9091$, G. L=7, $P=0.0935$ (diferencia marginal). Se utilizó una $n=6$ y 4 réplicas. La barra indica error estándar.

FASE II

7.2. Efecto de las NPs en interacción con glicina-betaína sobre el estadio temprano de desarrollo de maíz

Para llevar a cabo esta segunda fase experimental, las semillas de maíz fueron vernalizadas por 24h y posteriormente fueron sembradas en caja Petri. Después de la germinación (12 horas después) se suplementaron los distintos tratamientos con NPs de carbono y ferritas solas o combinadas con glicina-betaína en condiciones con y sin déficit hídrico. Se evaluaron las variables siguientes: la velocidad y porcentaje de germinación, posteriormente se evaluó la biomasa de las semillas y se realizaron pruebas histoquímicas que nos dan información sobre la formación de especies reactivas de oxígeno involucradas en procesos de repuesta de las semillas o plantas al estrés hídrico.

7.2.1. Evaluación de los efectos de los MWCNT solos o en sinergia con glicina betaína sobre la germinación y emergencia temprana de la semilla de maíz

7.2.1.1. Porcentaje y velocidad de germinación de maíz suplementado con MWCNT o la interacción MWCNT /G-B

Los resultados que se obtuvieron sobre el porcentaje y velocidad de germinación se muestran a continuación en las siguientes figuras (24, 25, y 26), se muestran en estas imágenes representativas en una línea de tiempo de 42 a 68 horas el rompimiento de la testa, emergencia de la radícula y crecimiento. Las semillas fueron embebidas con las NPs de MWCNT y MWCNT en interacción con glicina-betaína.

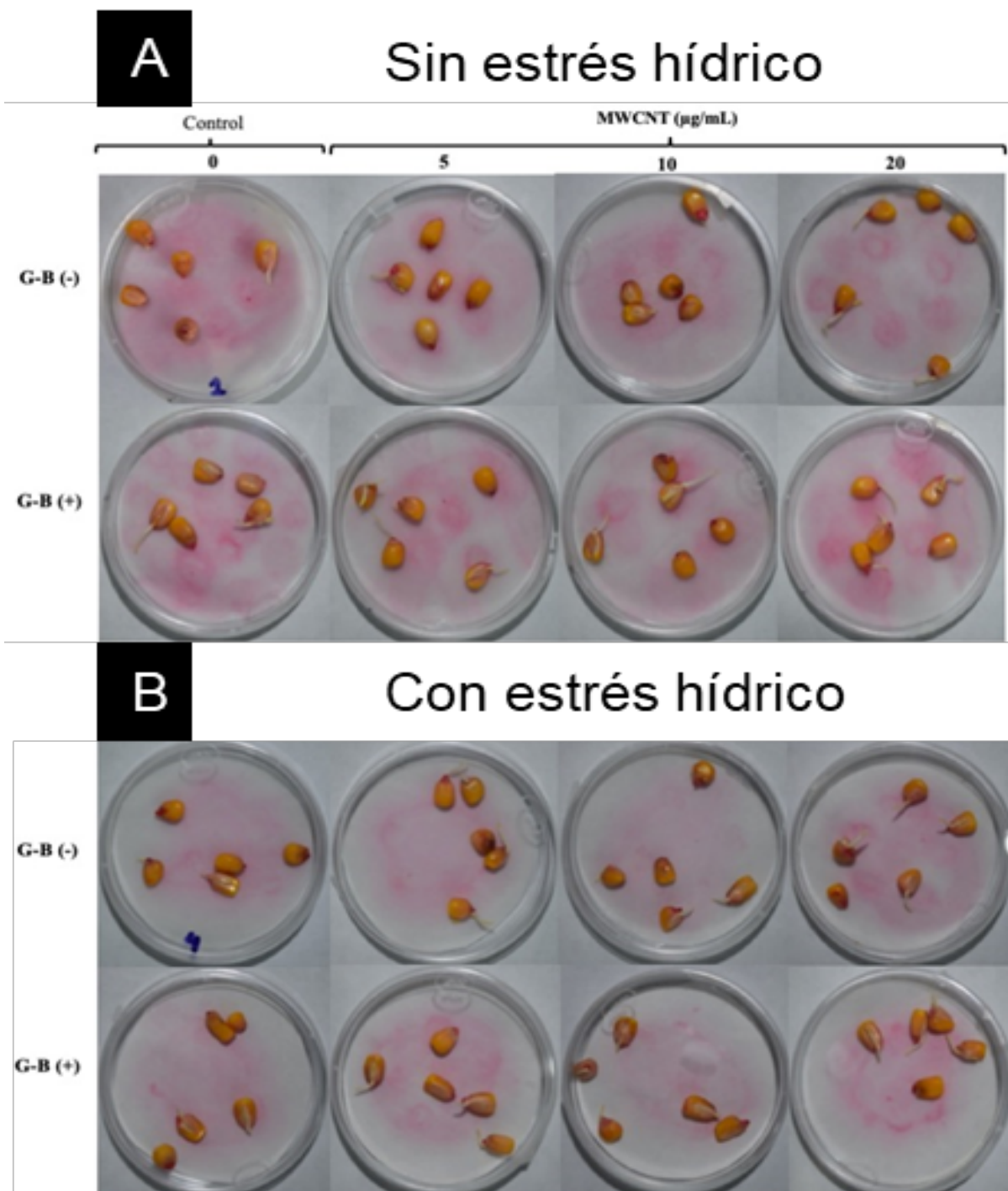


Figura 24 Germinación de la semilla de maíz cultivada con ferrita dopada suplementada con 0, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ con y sin glicina-betaína a las 42 h después de la siembra; A) semillas sin exposición a déficit hídrico. B) semillas expuestas a déficit hídrico.

Nota: G-B (+) = Con glicina-betaína; G-B (-) = Sin glicina-betaína.

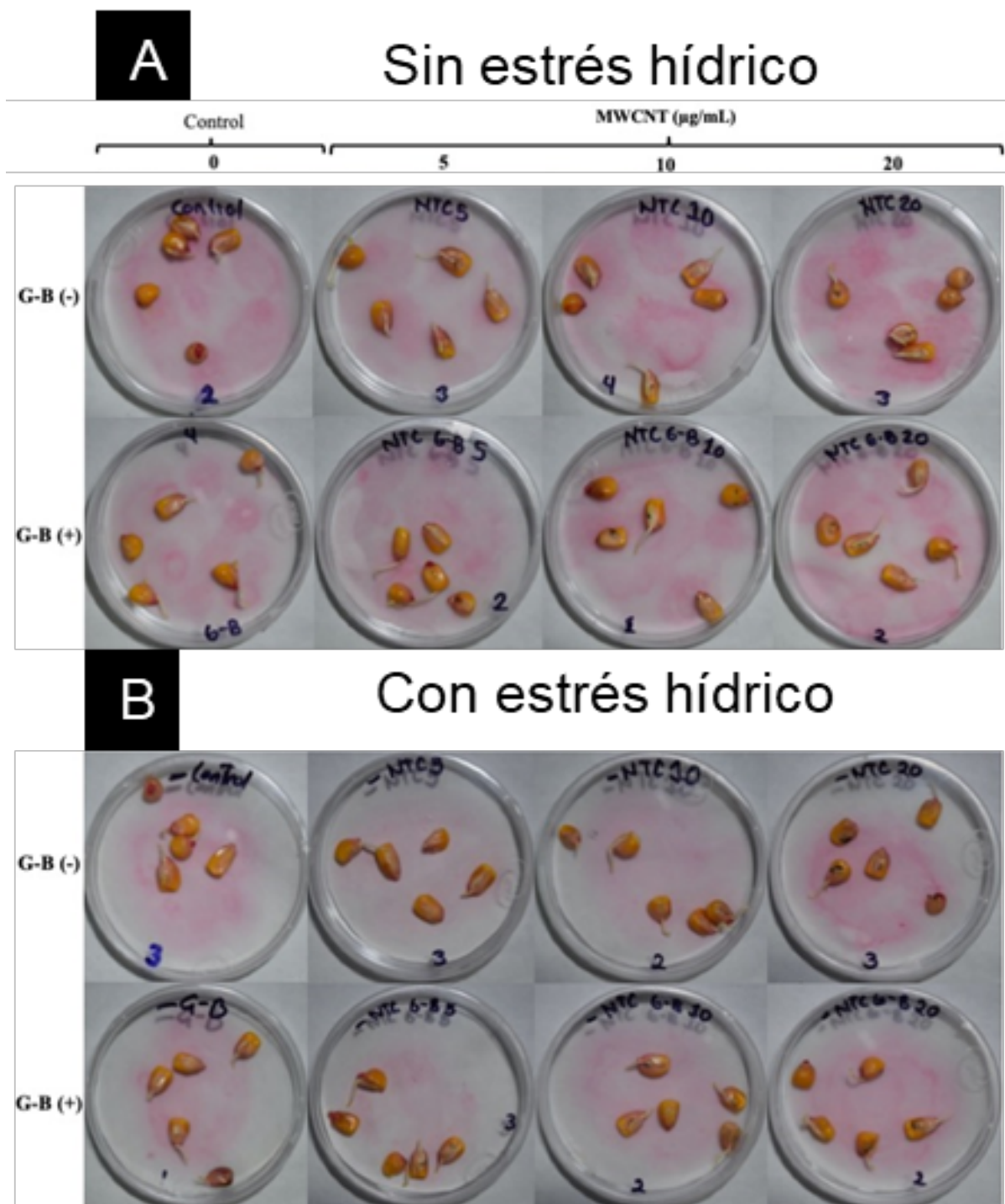


Figura 25 Germinación de la semilla de maíz con MWCNT en concentraciones de 0, 5, 10 y 20 µg/mL con y sin glicina-betaína a las 54 h después de la siembra. A) semillas sin exposición a déficit hídrico. B) semillas expuestas a déficit hídrico.

Nota: G-B (+) = Con glicina-betaína; G-B (-) = Sin glicina-betaína.

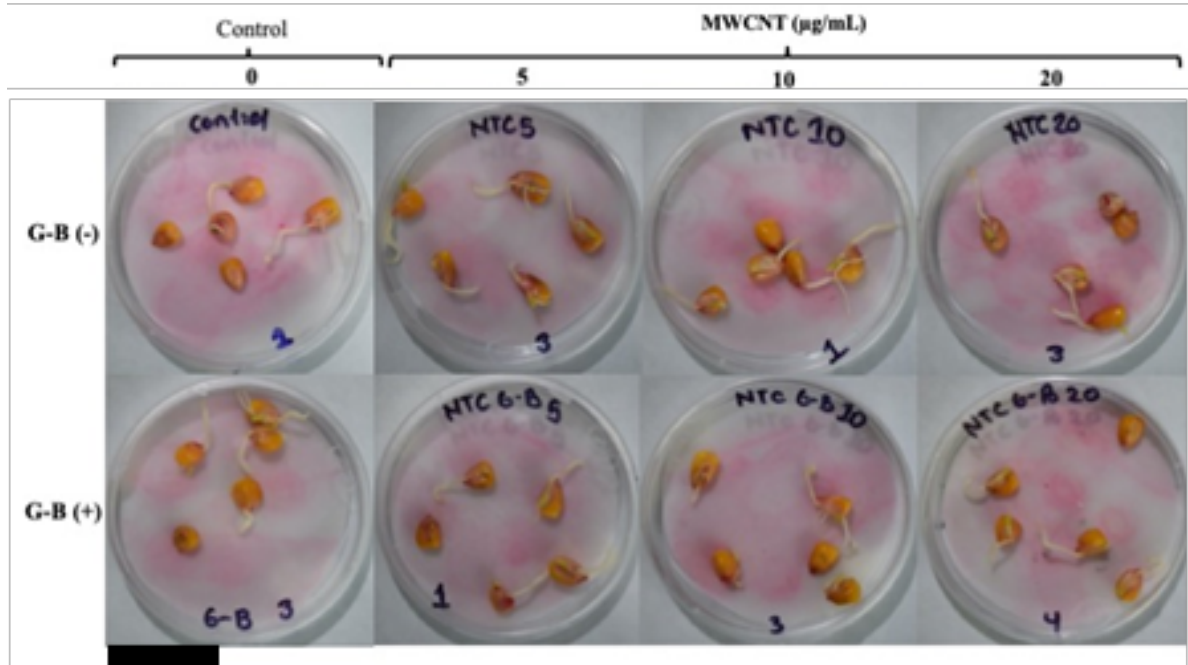
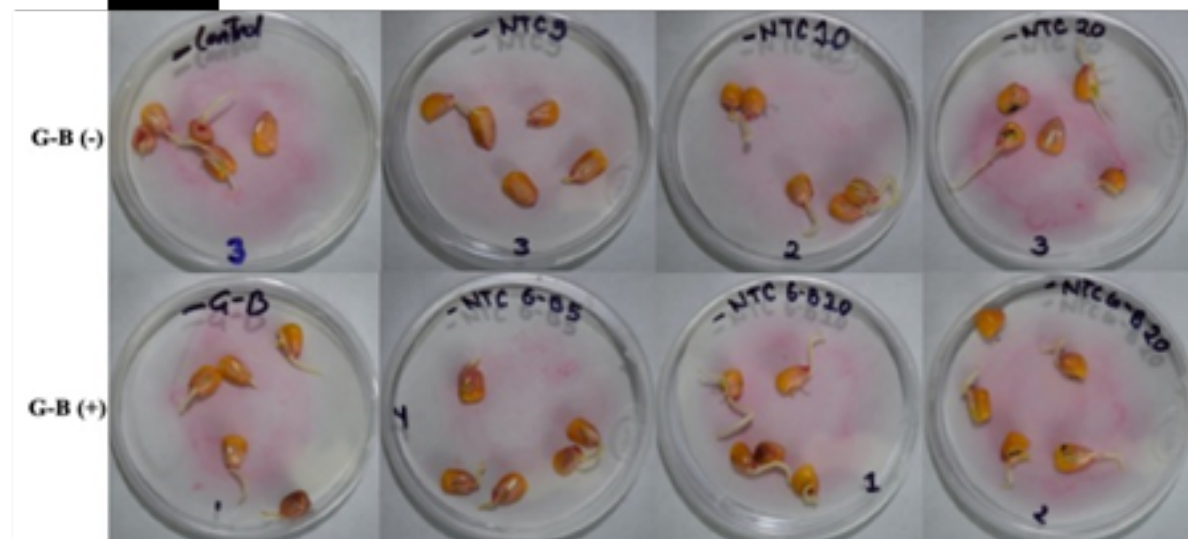
A**Sin estrés hídrico****B****Con estrés hídrico**

Figura 26 Germinación de semilla de maíz cultivada con MWCNT en concentraciones de 0, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ con y sin glicina-betaína a las 68 h después de la siembra A) semillas sin exposición a déficit hídrico. B) semillas expuestas a déficit hídrico.

Nota: G-B (+) = Con glicina-betaína; G-B (-) = Sin glicina-betaína.

En la Tabla 5, se muestra el análisis cuantitativo de la velocidad y porcentaje de germinación de la semilla de esta gramínea con los distintos tratamientos y expuestas a las condiciones de déficit hídrico y sin estrés hídrico. Los resultados mostraron que, en las semillas cultivadas sin déficit hídrico, los tratamientos con 10 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT a las 68 h después de ser cultivadas alcanzaron un mayor porcentaje y velocidad de germinación de esta semilla, y con la interacción de 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT con la glicina-betaína alcanzaron un 90% en las primeras 42h después de sembradas. Por otro lado, se observó que, en condiciones de déficit hídrico, la glicina-betaína en sinergia con las NPs de carbono a 20 $\mu\text{g/ml}$ alcanzaron un 90% de germinación, teniendo un efecto positivo tanto en porcentaje como en velocidad de germinación a las 42 h. en general, podemos observar que los distintos tratamientos revirtieron el efecto negativo del déficit hídrico, dado que en las semillas sin tratamiento se vio afectada de forma muy contundente la germinación.

Tabla 5 Porcentaje de germinación de maíz suplementado con MWCNT en interacción con Glicina betaína con y sin estrés hídrico.

Germinación de la semilla de maíz (%)						
	Tratamientos	MWCNT (µg/ml)	Horas después de la siembra			
			0	42	54	68
Sin estrés hídrico	Control (-) sin estrés	0	0	65±12.6	65±12.6	75±9.6
	Glicina-Betaína	0	0	65±12.6	65±12.6	70±10
	MWCNT	5	0	55±19	60±14.2	65±17
		10	0	75±12.6	75±12.6	95±5
		20	0	60±8.2	70±10	75±9.6
	MWCNT /Glicina-Betaína	5	0	90±10	90±10	90±10
		10	0	90±5.8	90±5.7	90±5.8
		20	0	70±26	80±8.2	80±8.2
Con estrés hídrico	Control (+) con estrés	0	0	15±9.6*	20±8.2*	20±8.2*
	Glicina-Betaína	0	0	85±5	90±5.8	95±5
	MWCNT	5	0	70±10	80±8.2	95±5
		10	0	70±13	70±13	85±9.6
		20	0	90±10	95±5	95±5
	MWCNT /Glicina-Betaína	5	0	80±0	85±5	95±5
		10	0	50±20	50±10	60±8.2
		20	0	65±9.6	75±5	75±5

Los datos fueron procesados con un análisis de supervivencia adaptado a la germinación con una distribución binomial $n=5$ y $p \leq 0.05$. Para la se evaluó la velocidad de germinación con un análisis de varianza de una vía. En una columna, el valor con un asterisco representa diferencias significativas.

Los resultados del análisis que fueron examinados para la fase II sin condiciones de estrés hídrico por porcentaje de germinación con $X^2=8.8122$, G.L.=7, $P=<0.27$ y una velocidad de germinación $F=3.56$, G.L.=7, $P=0.0017$ (diferencia estadísticamente significativa). Así mismo en condiciones de estrés hídrico el porcentaje de germinación con $X^2=7.0373$, G.L.=7, $P<0.4250$ y una velocidad de germinación $F=0.34$, G.L.=7, $P=1.000$.

7.2.1.2. Biomasa de semillas de maíz suplementadas con MWCNT con y sin interacción con glicina betaína en condiciones de déficit hídrico

En la figura 27, se muestran los resultados de la biomasa de las semillas de maíz suplementadas con los distintos tratamientos después de 24h del cebado con 5, 10 o 20 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT y MWCNT con glicina-betaína en condiciones de estrés hídrico y sin déficit hídrico. Los resultados obtenidos mostraron que en la semilla sin déficit hídrico el peso fresco no mostró diferencia entre los distintos tratamientos y la semilla control (Figura 27A), mientras que cuando se sometieron las semillas a déficit hídrico, se observó que las semillas suplementadas con glicina-betaína tuvieron un mayor peso fresco, significativamente superior a las semillas control, mientras que con los demás tratamientos no se detectaron diferencias (Figura 27B). Por otro lado, al evaluarse el peso seco de las semillas de maíz, también se observó que en condiciones sin déficit hídrico no se generaron diferencias entre los pesos de las semillas control y los distintos tratamiento (Figura 27C), pero al estar expuestas las semillas a una deficiencia de agua, la aplicación de 10 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT con glicina betaína afectó significativamente el peso seco de las semillas, mientras que los demás tratamientos mantuvieron un comportamiento similar entre ellos (Figura 27D).

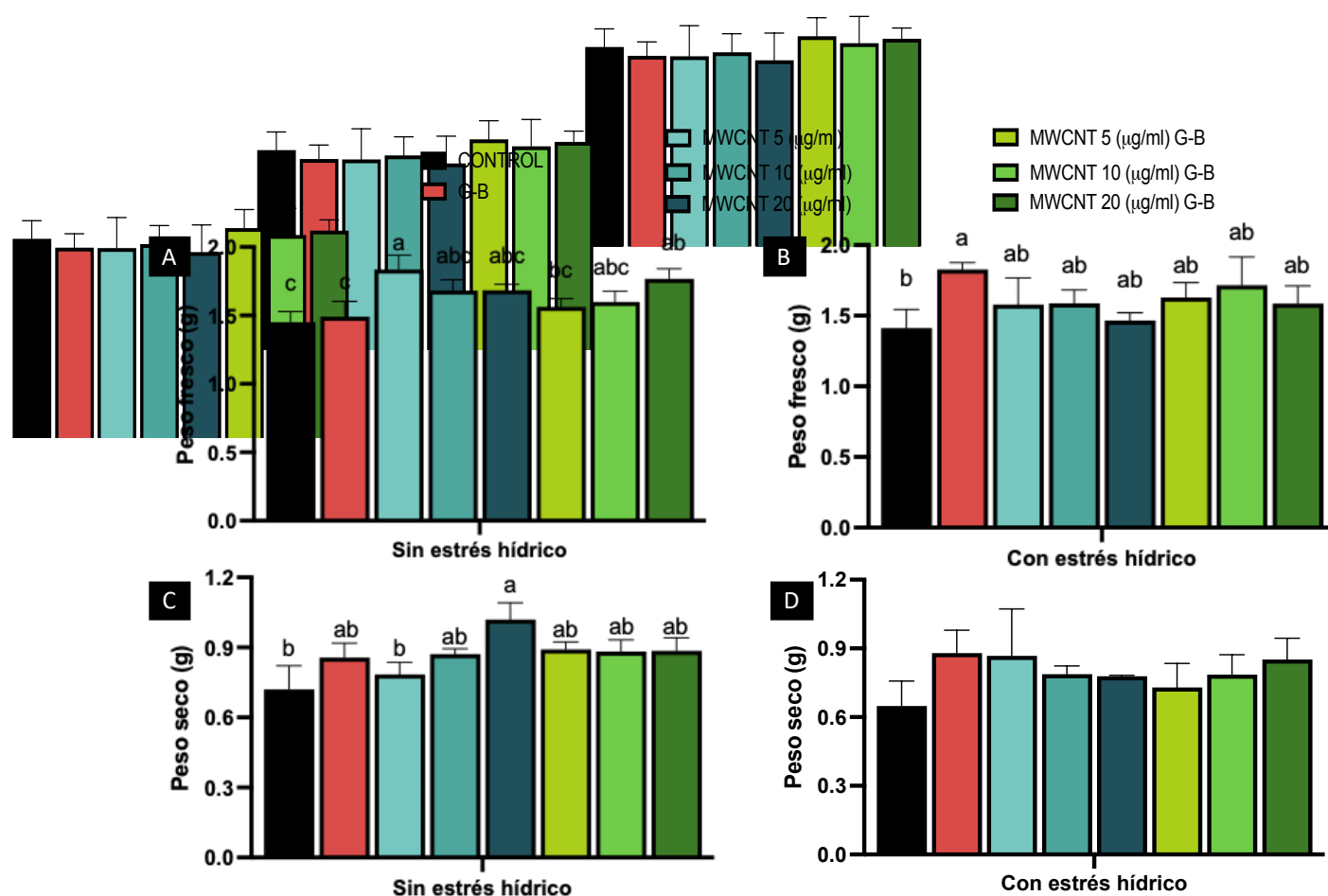


Figura 27 Biomasa de las semillas de maíz suplementadas con 5, 10 y 20 µg/ml de nanotubos de carbono con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés.

Los resultados fueron analizados con Fisher (LSD) con $p \leq 0.05$, $n=20$, la barra representa el error estándar.

7.2.1.3. Determinación de peróxido de hidrógeno en semillas de maíz suplementadas con MWCNT con y sin interacción con glicina betaína en condiciones de déficit hídrico

Para evaluar los efectos de las nanopartículas y su interacción con glicina-betaina sobre la semilla de maíz expuesta a condiciones de estrés hídrico, sobre la producción de ROS, se analizó la producción de H_2O_2 en las semillas (Figura 28). En la figura 28A, se muestran imágenes representativas de la tinción para la detección de H_2O_2 . Asimismo, en la figura 28B se muestra el análisis cuantitativo de H_2O_2 , donde se observa que el tratamiento con nanotubos de carbono en concentración 20 µg/ml y la interacción de 10 µg/ml con glicina betaína estimularon la síntesis de H_2O_2 en semillas sin exposición al

déficit hídrico, comparado con el tratamiento donde se suplementaron 5 µg/ml de MWCNT, donde se disminuyó la presencia de H₂O₂ en las semillas (Figura 28C), sin embargo, no se detectaron diferencias significativas con respecto de los demás tratamientos y las semillas control. En contraste, observamos que con este tratamiento de 5 µg/ml de MWCNT, cuando las semillas estuvieron expuestas a déficit hídrico, estimuló la formación de este radical libre, comparado con las semillas control y con las que fueron suplementadas con 10 µg/ml de MWCNT y con la interacción de 10 µg/ml con glicina betaína, donde se detectó una producción significativamente menor de H₂O₂ (Figura 28D).

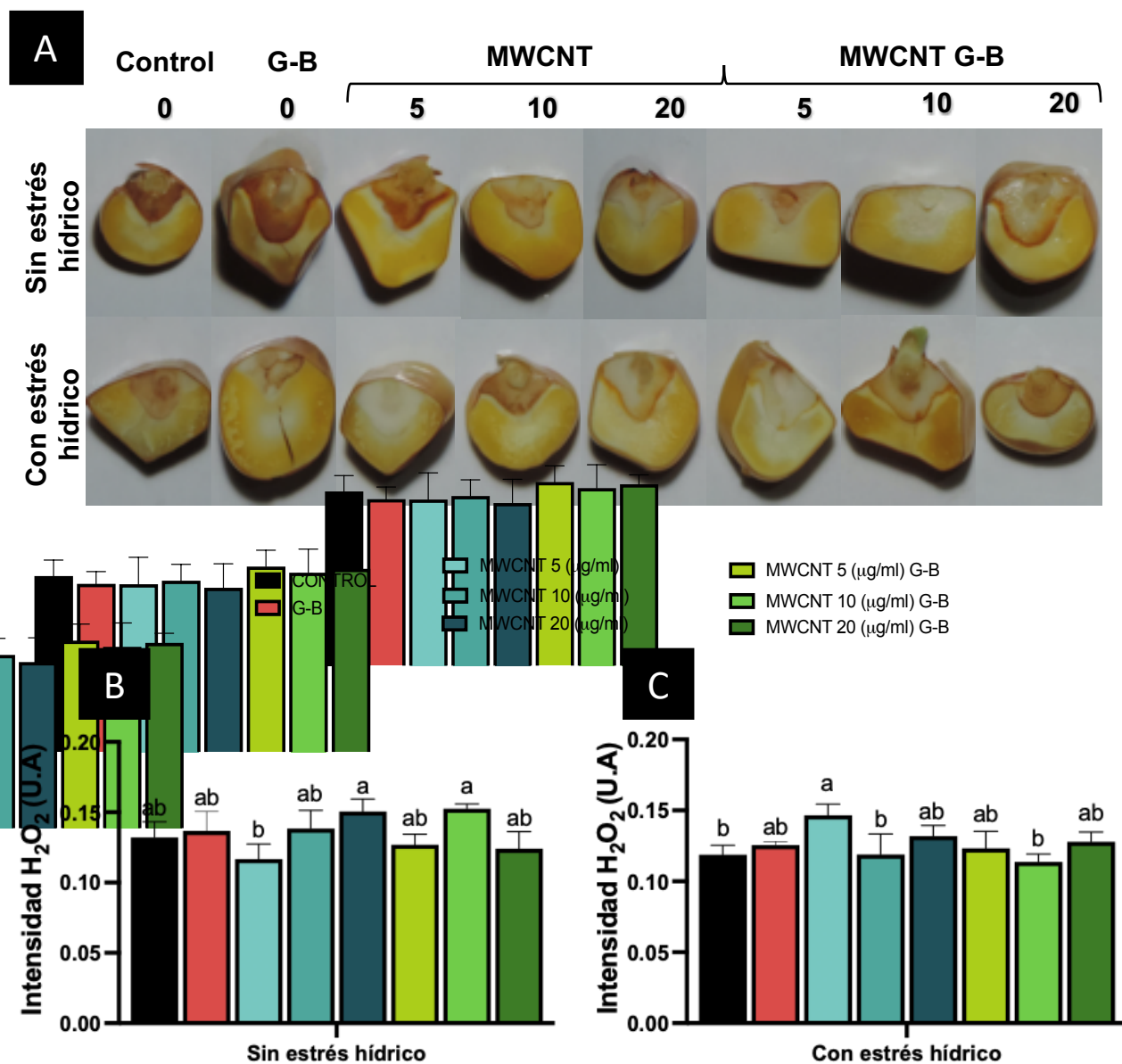


Figura 28 Peróxido de hidrógeno en semillas de maíz suplementado con 0, 5, 10 y 20 $\mu g/ml$ de nanotubos de carbono con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés. A) Imágenes representativas de las semillas de maíz teñidas con DAB para detección de H_2O_2 ; B) Cuantificación de H_2O_2 en semilla de maíz sin déficit hídrico; C) Cuantificación de H_2O_2 en semilla de maíz con déficit hídrico.

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía / Fisher (LSD). Con valor de $F=1.39$, G. L=7 $P=0.24$ para B) y $F=1.38$, G. L=7, $P=0.24$ para C), Se utilizó una $n=6$ y 4 réplicas. La barra indica error estándar.

7.2.1.4. Cuantificación de deshidrogenasas de la semilla de maíz con MWCNT

Se evaluaron los efectos de las nanopartículas y su interacción con glicina-betaína sobre la síntesis de deshidrogenasas en semilla de maíz expuesta a condiciones de estrés hídrico, mediante detección histoquímica con TTC al 0,1% (p/v). Los resultados se muestran en la figura 29. Se muestran imágenes representativas de las semillas teñidas con TTC en la figura 29A. Asimismo, en la figura 29B se muestra los resultados obtenidos de la cuantificación de deshidrogenasas, donde se observó que la producción de deshidrogenasas en las semillas sin exposición a déficit hídrico, al suplementarlas con 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT, mostraron una mayor producción de estas enzimas, comparado con las semillas control y los tratamientos en donde se aplicó la glicina-betaína en sinergia con MWCNT. Por otro lado, cuando se expusieron las semillas al estrés hídrico, pudimos observar que con la adición de 20 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT se estimuló significativamente la producción de deshidrogenasas, y en contraste, la adición de glicina-betaína sola, redujo la producción de estas enzimas, por otra parte, la relación entre los demás tratamientos no mostró diferencias significativamente representativas.

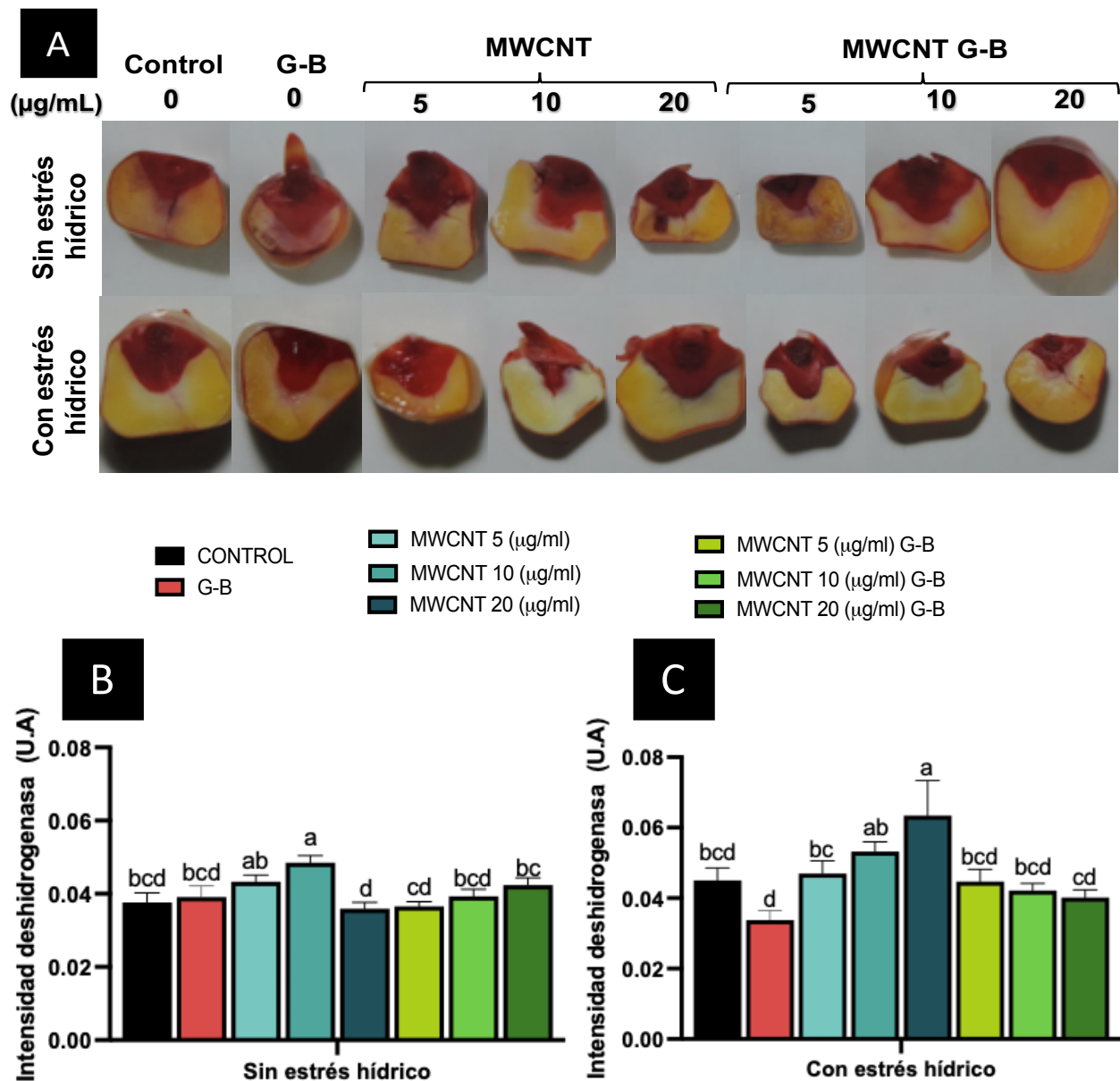


Figura 29 Deshidrogenasas de la semilla de maíz suplementadas con 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de nanotubos de carbono con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés; A) Imágenes representativas de las semillas de maíz teñidas con TTC para evaluar intensidad de deshidrogenasas; B) Deshidrogenasas en semilla de maíz sin déficit hídrico; C) Deshidrogenasas en semilla de maíz con déficit hídrico.

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía / LSD. Para B) Con un valor de $F=3.9559$, G. L=7 $P=0.002$ (diferencia significativa) y para C) $F=3.99$, G. L=7, $P=0.022$ (diferencia significativa). Se utilizó una $n=6$ y 4 réplicas. La barra indica error estándar.

7.2.1.5. Cuantificación histoquímica de superóxidos (O_2^-) en semillas de maíz suplementadas con MWCNT o la sinergia MWCNT/G-B en condiciones de estrés hídrico.

Se evaluaron los efectos de las nanopartículas y su interacción con glicina-betaína sobre la semilla de maíz expuesta a condiciones de estrés hídrico, sobre la síntesis de superóxidos mediante una tinción de nitroblu de tetrazolium. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 30, donde se muestran imágenes representativas de la acumulación de esta ROS en distintas zonas de las semillas (Figura 30A). Asimismo, se muestra el análisis cuantitativo de la producción de O_2^- donde las semillas fueron cultivadas sin estrés hídrico (Figura 30B), los resultados mostraron que en las semillas donde se adicionó la combinación de 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT con glicina-betaína, especialmente con la interacción de 5 $\mu\text{g/ml}$ donde se generó la mayor intensidad de la formación de O_2^- , por el contrario, en los demás tratamientos no se detectaron diferencias entre ellos o con la semilla control. Por otro lado, cuando las semillas estuvieron expuestas a déficit hídrico, se observó que no hubo diferencias entre las semillas control y los distintos tratamientos, a excepción del tratamiento donde se suplementaron 5 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT, donde significativamente se ve disminuida la producción de esta ROS (Figura 30C).

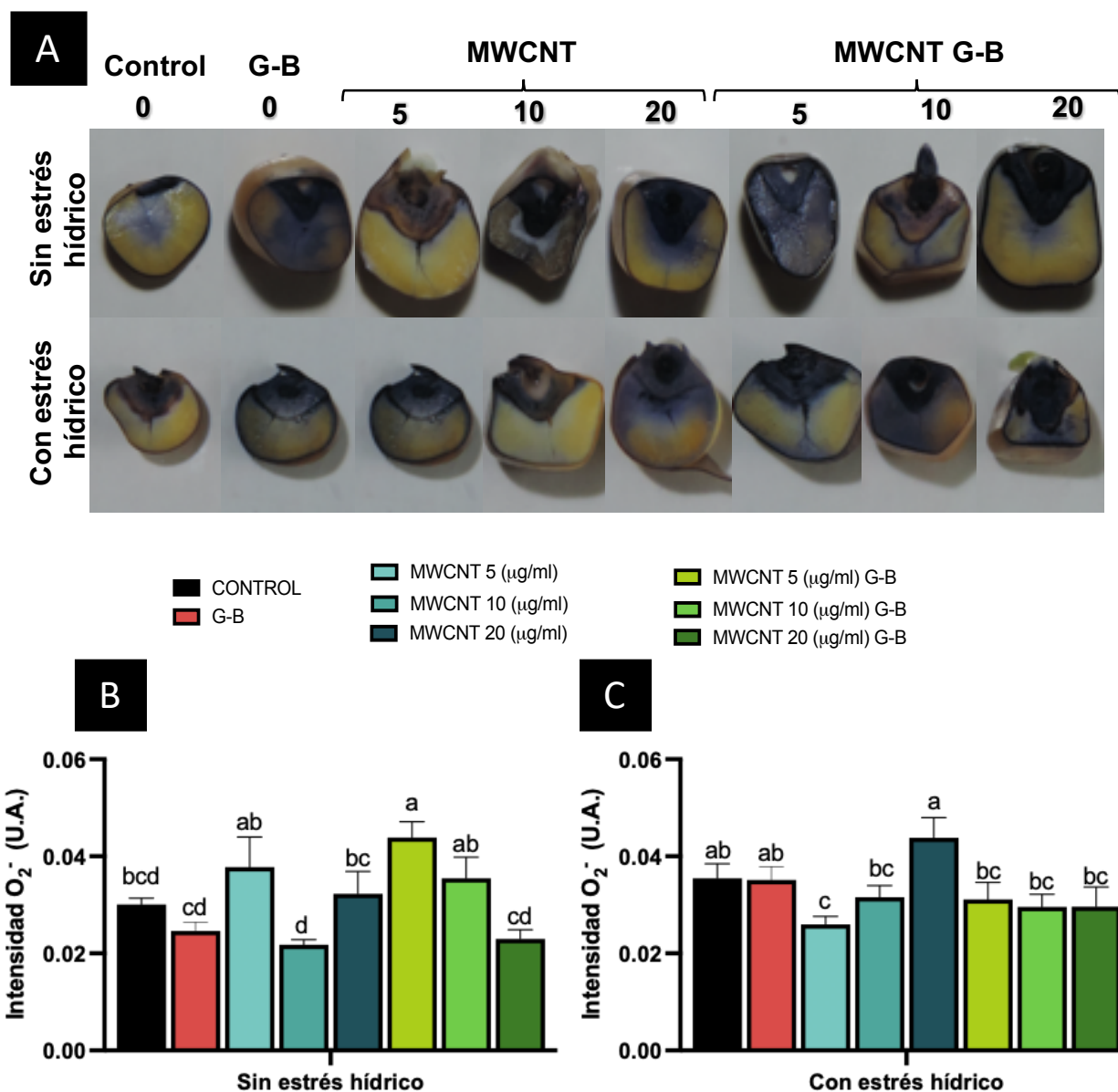


Figura 30 Intensidad de O_2^- en semilla de maíz suplementada con 0, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNT con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés. A) Imágenes representativas de las semillas de maíz teñidas con (DAB) para detección de O_2^- ; B) Cuantificación de O_2^- en semilla de maíz sin déficit hídrico; C) Cuantificación de O_2^- en semilla de maíz con déficit hídrico.

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía / LSD con $p \leq 0.05$, $n=6$, 4 réplicas. Para B) Con un valor de $F=1.29$, G. L=7 $P=0.28$ y para C) $F=1.9091$, G. L=7, $P=0.0935$ (diferencia marginal). La barra indica error estándar.

7.2.2. Evaluación de los efectos de MgFe_2O_4 y la interacción $\text{MgFe}_2\text{O}_4/\text{G-B}$ sobre las semillas de maíz en condiciones de déficit hídrico.

7.2.2.1. Porcentaje y velocidad de germinación de maíz suplementado con MgFe_2O_4 , y la sinergia MgFe_2O_4 G-B ne condiciones de déficit hídrico

Para evaluar el efecto de las ferritas dopadas con magnesio y su sinergia con glicina betaína sobre la respuesta de las semillas de maíz expuestas a déficit hídrico y en condiciones sin estrés hídrico, se evaluó la velocidad y porcentaje de germinación a las 42, 54 y 68h después de la siembra en bioensayos dosis respuesta. Posteriormente se evaluó el peso fresco y seco de las semillas, por último, se realizaron pruebas histoquímicas que nos dieron información sobre la síntesis de ROS asociadas a la respuesta de estrés en las semillas y plantas. En las figuras 31, 32 y 33 se muestran imágenes representativas de la germinación de las semillas con los distintos tratamientos en los tres periodos de tiempo evaluados.

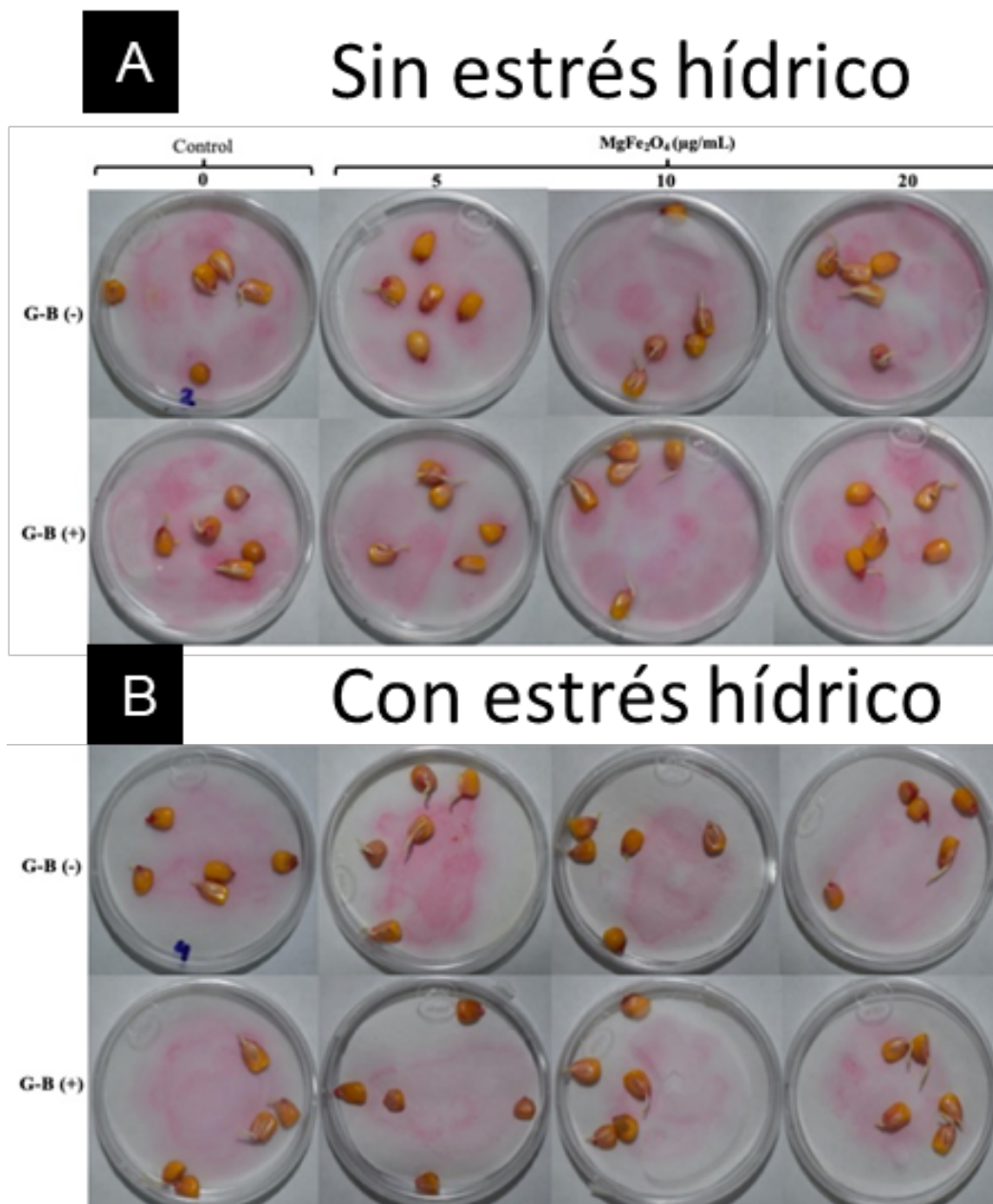


Figura 31 Germinación de la semilla de maíz cultivada con ferrita dopada con magnesio suplementada con 0, 5, 10 y 20 μg/ml con y sin glicina-betaína a las 42 h después de la siembra; A) sin estrés hídrico y B) en condiciones de estrés hídrico.

Nota: G-B (+) = Glicina-betaína; G-B (-) = Sin glicina-betaína.

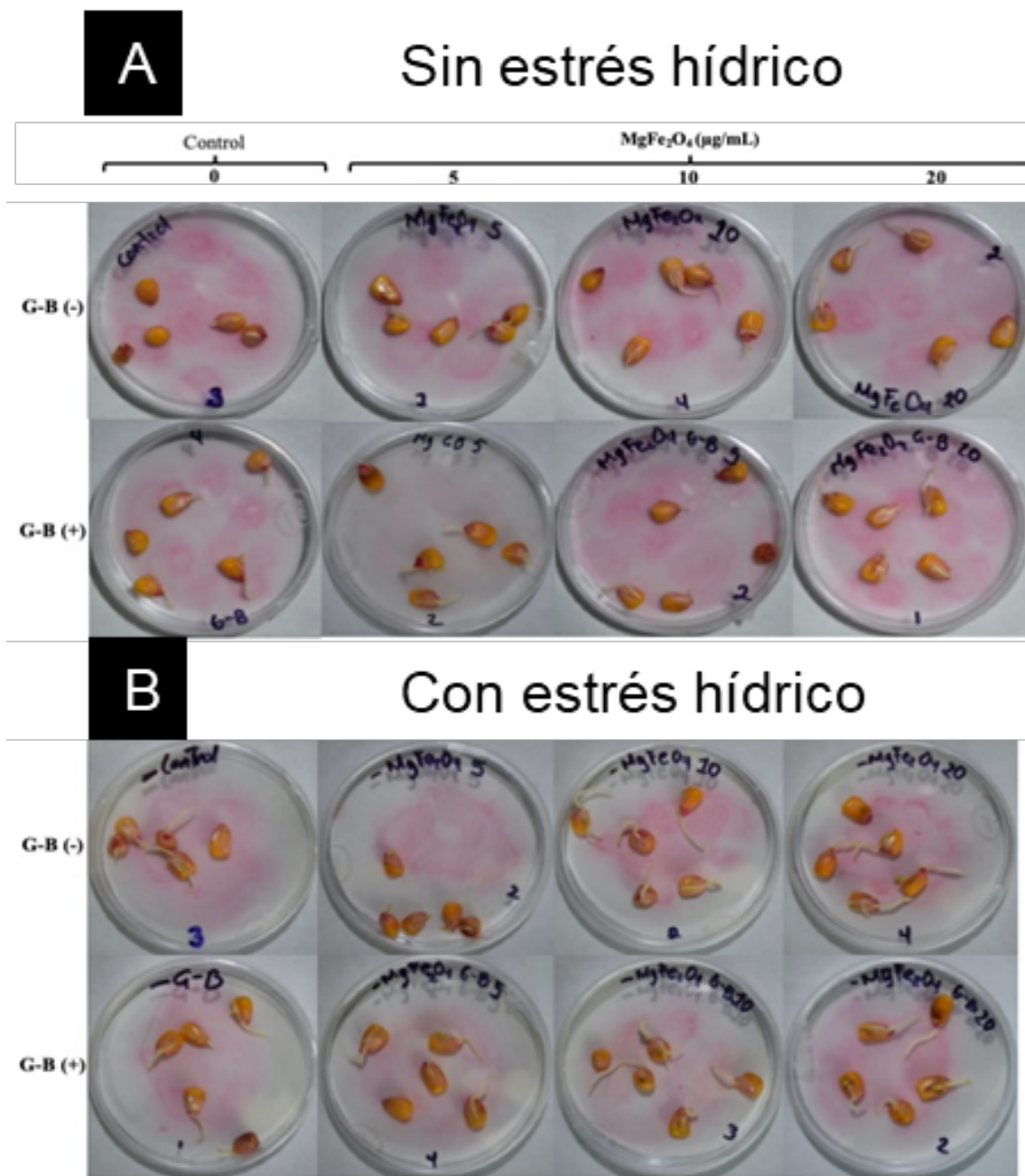


Figura 32 Germinación de la semilla de maíz cultivada con ferrita dopada con magnesio suplementada con 0, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ con y sin glicina-betaína a las 54 h después de la siembra; A) sin estrés hídrico y B) en condiciones de estrés hídrico.

Nota: G-B (+) = Glicina-betaína; G-B (-) = Sin glicina-betaína

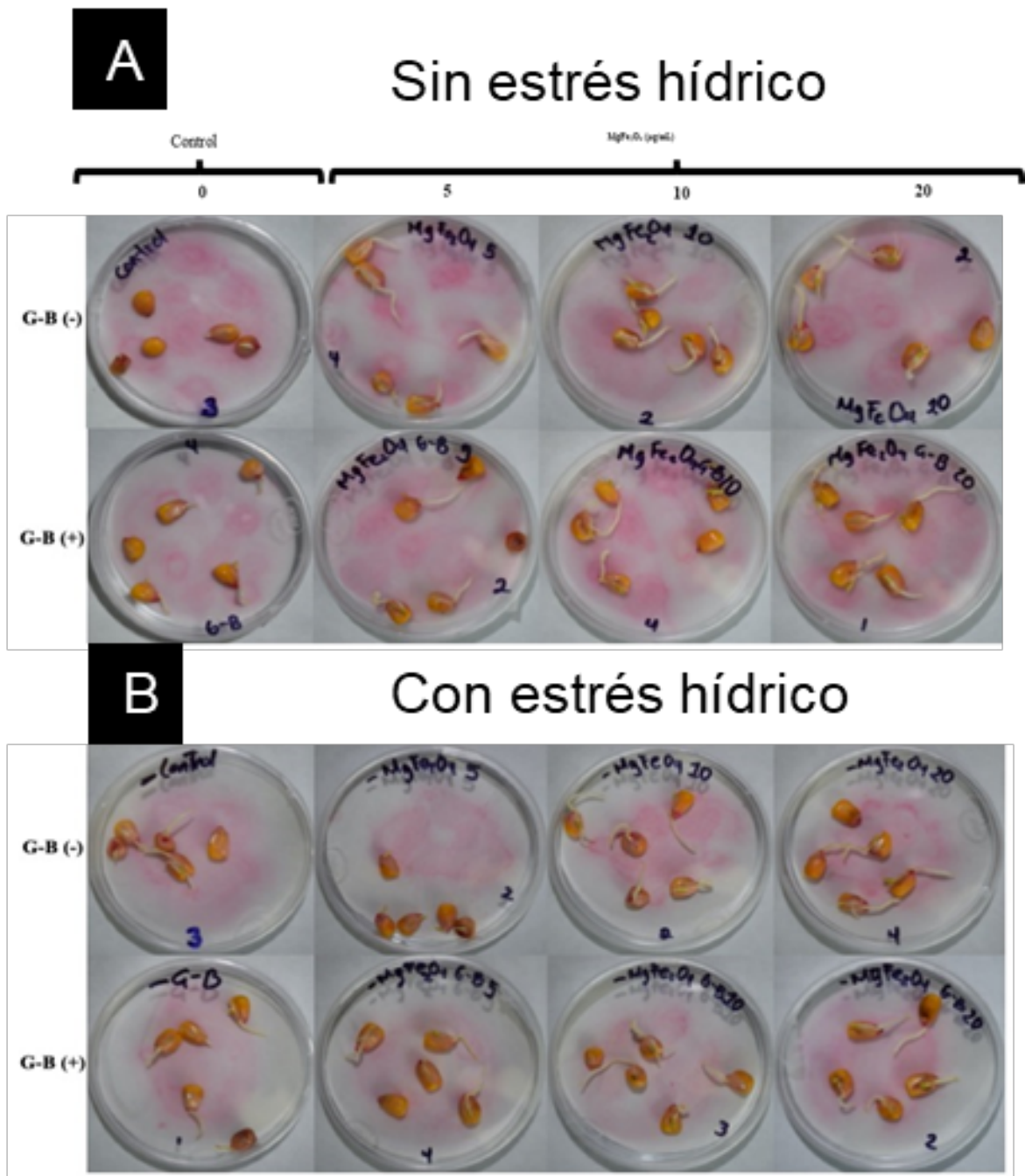


Figura 33 Germinación de la semilla de maíz cultivada con ferrita dopada con magnesio suplementada con 0, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ con y sin glicina-betaína a las 68 h después de la siembra; A) sin estrés hídrico y B) en condiciones de estrés hídrico

Nota: G-B (+) = Glicina-betaína; G-B (-) = Sin glicina-betaína

En la Tabla 6 se muestra el análisis cuantitativo de la velocidad y porcentaje de germinación de la semilla de esta gramínea con los distintos tratamientos y expuestas a las condiciones de déficit hídrico y sin estrés hídrico. Los resultados mostraron que, en las semillas cultivadas sin estrés hídrico con los distintos tratamientos, no mostraron diferencias en porcentaje o velocidad de germinación significativamente considerables entre ellos o con las semillas control. Por el contrario, se observó que al suplementar de forma individual la glicina-betaína y las diferentes concentraciones de NPs de MgFe_2O_4 , así como la sinergia de NPs con glicina-betaína estimularon la germinación desde las primeras 24 h después de la siembra y este efecto se mantuvo consistente durante las 68 h posteriores a la siembra, lo que demuestra que estos tratamientos están contrarrestando los efectos negativos causados por el déficit hídrico.

Tabla 6 Porcentaje de germinación de semillas de maíz suplementadas con ferritas de magnesio en interacción con glicina-betaína con y sin estrés hídrico.

Germinación de la Semilla de maíz (%)						
	Tratamientos	MgFe ₂ O ₄ (µg/ml)	Horas después de la siembra			
			0	42	54	68
Sin estrés hídrico	Control (-) estrés	0	0	45±9.6	55±5	70±5.8
	Glicina-Betaína	0	0	40±11.6	70±5.8	70±5.8
	MgFe ₂ O ₄	5	0	70±10	70±10	75±12.5
		10	0	55±9.6	80±8.1	85±5
		20	0	70±5.8	70±5.8	75±5
	MgFe ₂ O ₄ / Glicina-Betaína	5	0	55±9.6	65±9.6	70±5.8
		10	0	45±12.5	70±10	75±5
		20	0	90±5.8*	90±5.8	95±5
Con estrés hídrico	Control (+) estrés	0	0	70±12.9	75±15	85±9.6
	Glicina-Betaína	0	0	65±9.6	65±9.6	75±12.6
	MgFe ₂ O ₄	5	0	95±5	95±5	100±0
		10	0	75±5	95±5	95±5
		20	0	50±5.8	75±12.6	80±14.1
	MgFe ₂ O ₄ / Glicina-Betaína	5	0	60±21.6	80±8.1	85±5
		10	0	55±5	65±9.6	75±5
		20	0	60±16.3	80±11.5	90±5.6

Los datos fueron procesados con un análisis de supervivencia adaptado a la germinación con una distribución binomial n=5 y p≤0.05. Para la se evaluó la velocidad de germinación con ANOVA de una vía. En una columna, el valor con un asterisco representa diferencias significativas.

Los resultados del análisis que fueron examinados para la fase I sin condiciones de estrés hídrico por porcentaje de germinación con $X^2=12.5609$, G.L.=7, $P=<0.0836$ (Diferencia marginal) y una velocidad de germinación $F=1.18$, G.L.=7, $P=0.032$ (diferencia estadísticamente significativa). Asimismo, en condiciones de estrés hídrico el porcentaje de germinación con $X^2=13.6222$, G.L.=7, $P=<0.0583$ (Diferencia marginalmente significativa) y una velocidad de germinación $F=0.72$ G.L.=7, $P=0.65$.

7.2.2.2. Biomasa de semillas de maíz suplementadas con nanopartículas de MgFe_2O_4 o la interacción $\text{MgFe}_2\text{O}_4/\text{G-B}$ en condiciones de déficit hídrico.

Los resultados obtenidos sobre la biomasa de las semillas de maíz cultivadas con y sin déficit hídrico suplementadas con las NPs y su interacción con glicina betaína se muestran en la figura 34. Los resultados obtenidos mostraron que el peso fresco de las semillas sin exposición al déficit hídrico no mostró diferencias entre las semillas control y los distintos tratamientos (Figura 34A), mientras que, al exponer las semillas a una deficiencia de agua, pudimos observar que los distintos tratamientos tampoco mostraron diferencias significativas entre ellos o la semilla control, a excepción del tratamiento con glicina betaína, que mostró estimular el peso fresco de esta semilla (Figuras 34B). Por otro lado, al evaluar el peso seco de las semillas, al igual que con el peso fresco, las semillas sin exposición a déficit hídrico no reportaron diferencias entre los distintos tratamientos (Figuras 34C), sin embargo, pudimos observar que los tratamientos en las semillas expuestas a déficit hídrico mostraron un mayor peso seco, siendo significativamente superior el tratamiento con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de nanopartículas de MgFe_2O_4 en sinergia con la glicina-betaína (Figuras 34D).

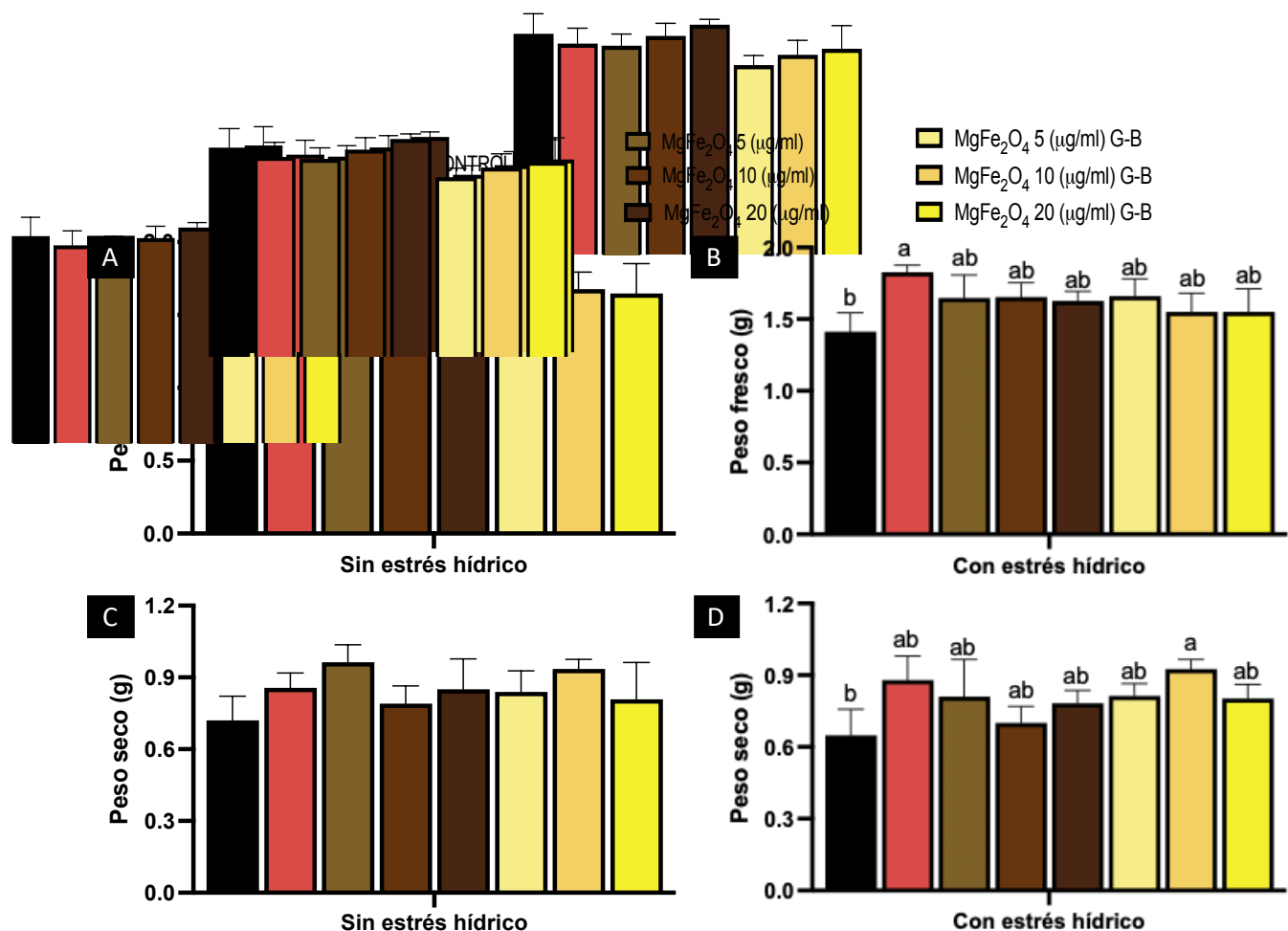


Figura 34 Biomasa de las semillas de maíz suplementadas con 5, 10 y 20 µg/ml de nanopartículas de MgFe₂O₄ con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés.

Los resultados fueron analizados con Fisher (LSD) con $p \leq 0.05$, $n=20$, la barra representa el error estándar.

7.2.2.3. Determinación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de en semillas de maíz suplementadas con MgFe₂O₄ o MgFe₂O₄-GB en condiciones de déficit hídrico.

Para la localización y cuantificación de H₂O₂ en las semillas se realizó un análisis histoquímico con DAB al 0,1% (p/v). En la figura 35A se muestran imágenes representativas de las semillas de maíz teñidas. Mientras que en la figura 35B se muestra el análisis cuantitativo del H₂O₂ en las semillas que no fueron expuestas a déficit hídrico, donde se observó que la detección de H₂O₂ fue similar en todos los tratamientos (Figura 35C). En contraste, cuando las semillas estuvieron con deficiencia de agua, se observó que en los tratamientos con 5 y 10 µg/ml de NPs en combinación con glicina betaína, se

estimuló significativamente la presencia de H_2O_2 en las semillas, mientras que con 10 $\mu g/ml$ de estas ferritas, se inhibió fuertemente la síntesis de este compuesto (Figura 35C).

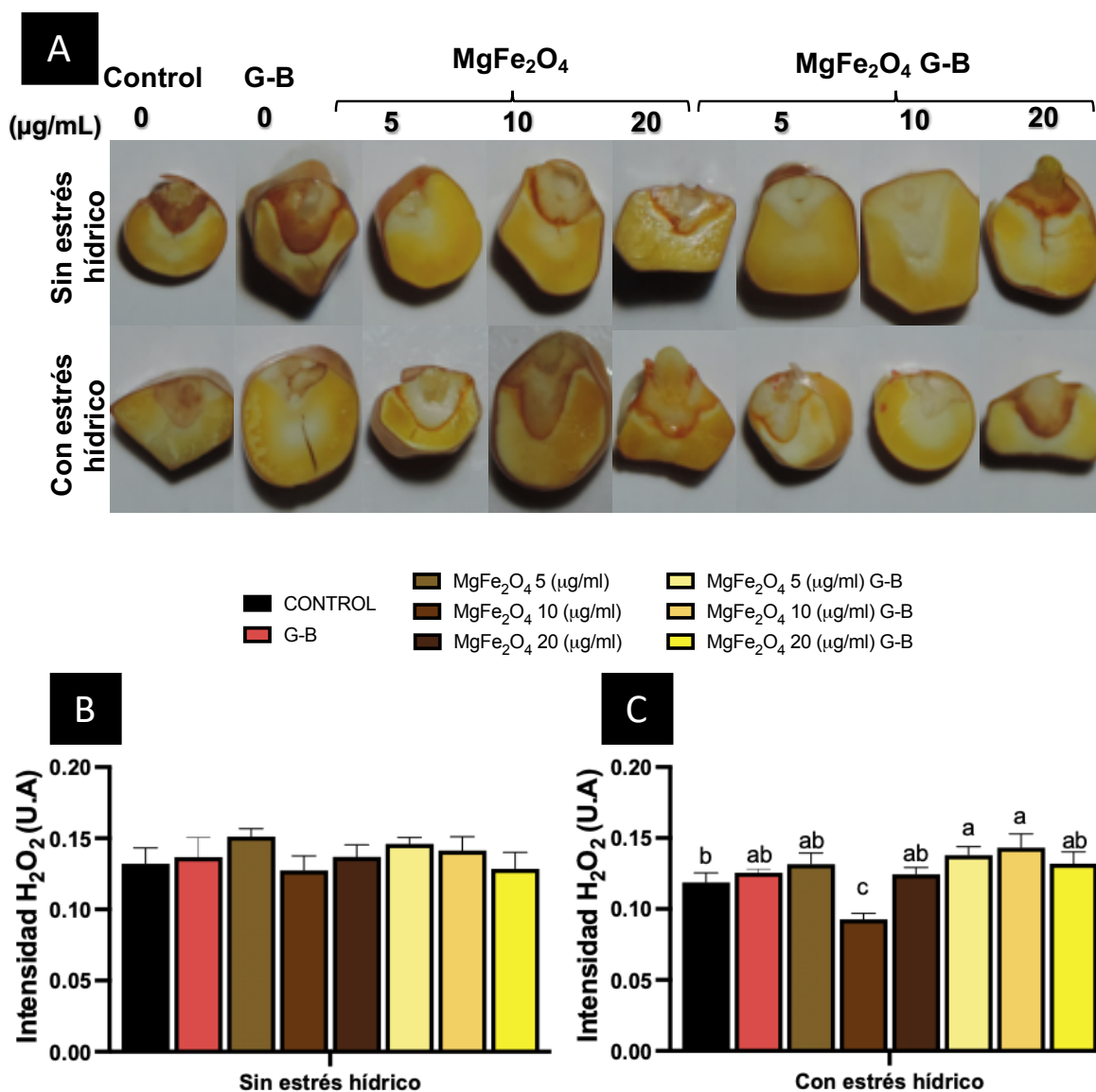


Figura 35 Peróxido de hidrógeno en semillas de maíz suplementados con 5, 10 y 20 $\mu g/ml$ de $MgFe_2O_4$ con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés. A) Imágenes representativas de las semillas de maíz teñidas con DAB para detección de H_2O_2 ; B) Cuantificación de H_2O_2 en semilla de maíz sin déficit hídrico; C) Cuantificación de H_2O_2 en semilla de maíz con déficit hídrico.

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía / LSD con $p \leq 0.05$, $n=6$, 4 réplicas. Con valor de $F=0.73$, G. L=7 $P=0.65$ para B) y $F=5.39$, G. L=7, $P=0.0002$ (diferencia significativa) para C), La barra indica error estándar.

7.2.2.4. Determinación de deshidrogenasas en semillas de maíz suplementadas con MgFe_2O_4 o la interacción MgFe_2O_4 /G-B en condiciones de déficit hídrico

Para la localización y cuantificación de deshidrogenasas en las semillas se realizó un análisis histoquímico con TTC al 0,1% (p/v). En la figura 36A se muestran imágenes representativas de las semillas teñidas con TTC para detección de deshidrogenasas. Mientras que en la figura 36B se muestra el análisis cuantitativo de las deshidrogenasas en semillas sin exposición a déficit hídrico, donde los resultados mostraron que la aplicación de 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de ferritas estimularon la producción de deshidrogenasas en las semillas. Por otro lado, con la exposición de las semillas a una deficiencia de agua se observó que las deshidrogenasas se incrementaron significativamente en el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ de ferritas, en contraste, la adición de glicina-betaína de forma individual inhibió la producción de estas enzimas (Figura 36C).

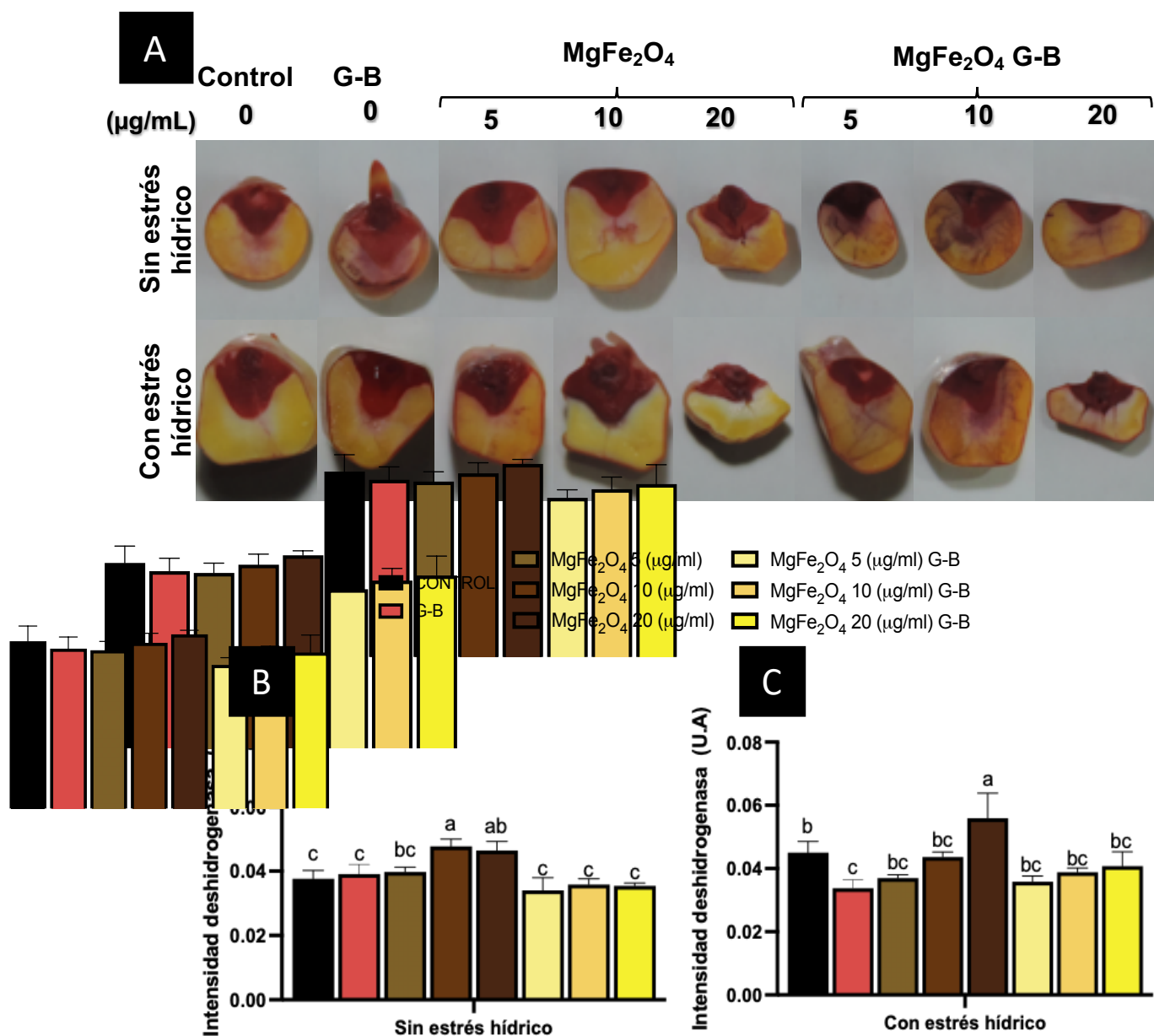


Figura 36 Intensidad de deshidrogenasas de la semilla de maíz suplementadas con 5, 10 y 20 μg/ml de MgFe₂O₄ con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés; A) Imágenes representativas de las semillas de maíz teñidas con TTC para intensidad de deshidrogenasas; B) Intensidad de deshidrogenasas en semilla de maíz sin déficit hídrico; C) Intensidad de deshidrogenasas en semilla de maíz con déficit hídrico.

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía / LSD con $p \leq 0.05$, $n=6$, 4 réplicas. Para B) Con un valor de $F=4.29$, G. L=7 $P<0.002$ (diferencia significativa) y para C) $F=3.52$, G. L=7, $P=0.005$ (diferencia significativa). La barra indica error estándar.

7.2.2.1. Cuantificación histoquímica de superóxidos (O_2^-) en semillas de maíz suplementadas con $MgFe_2O_4$ o $MgFe_2O_4$ /G-B

Se evaluaron los efectos de las nanopartículas y su interacción con glicina-betaína sobre la semilla de maíz expuesta a condiciones de estrés hídrico, sobre la síntesis de superóxidos mediante una tinción de nitroblu de tetrazolium NBT. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 37, donde se muestran imágenes representativas de la acumulación de esta ROS en distintas zonas de las semillas (Figura 37A).

Asimismo, se muestra el análisis cuantitativo de la producción de O_2^- donde las semillas fueron cultivadas sin estrés hídrico (Figura 37B), donde se observó que la adición de 5 y 20 $\mu g/ml$ de ferritas estimularon significativamente la formación de O_2^- , mientras que la adición de 20 $\mu g/ml$ de NPs con la interacción con glicina-betaína significativamente disminuyeron la formación de esta ROS. Por otro lado, observamos que en las semillas cultivadas con déficit hídrico la adición de tanto la adición de 20 $\mu g/ml$ de NPs, así como la adición de estas ferritas en sinergia con glicina betaína a las concentraciones probadas, inhibieron significativamente la producción de O_2^- .

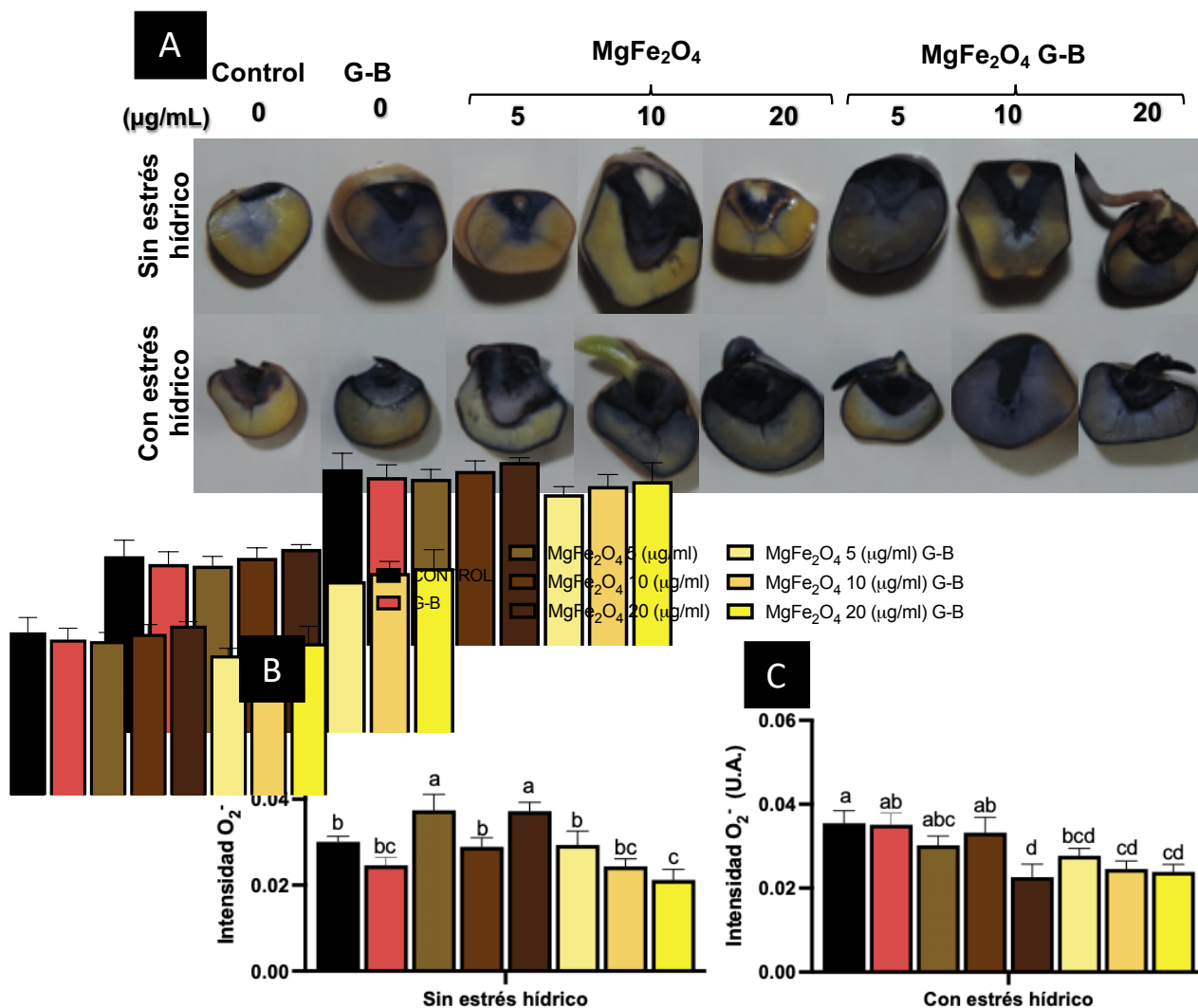


Figura 37 Producción de O_2^- en semillas de maíz suplementados con 0, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de ferritas dopadas con magnesio con y sin interacción glicina-betaína, bajo condiciones de estrés hídrico y sin estrés. A) Imágenes representativas de las semillas de maíz teñidas con DAB; B) Cuantificación de O_2^- en semilla de maíz sin déficit hídrico; C) Cuantificación de O_2^- en semilla de maíz con déficit hídrico.

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía / LSD con $p \leq 0.05$, $n=6$, 4 réplicas. Para B) Con un valor de $F=5.8947$, G. L=7 $P=0.0001$ (diferencia significativa) y para C) $F=3.9534$, G. L=7, $P=0.0023$ (diferencia significativa). La barra indica error estándar.

8. DISCUSIÓN

Diversas investigaciones han documentado el efecto de las nanopartículas en la promoción del crecimiento de las plantas y su contribución a reducir el impacto del estrés hídrico de estas (Vázquez-Núñez, 2022). Recientemente, se ha documentado el papel de nanomateriales de biocarbón en aplicaciones relacionadas con la nanoagricultura y se ha demostrado que dichos nanomateriales estimulan el crecimiento de las plantas (Yue et al., 2023), aceleran la germinación de las semillas, mejorando la resistencia de las plantas al estrés tanto abiótico como biótico (Ilyas et al., 2023).

8.1. Nanomateriales de Carbono

Nuestros resultados mostraron, que en la fase I existieron diferencias significativas importantes en los tratamientos adicionados con las diferentes concentraciones de nanopartículas solas o combinadas con Glicina-Betaína sobre los procesos de germinación en condiciones de estrés. Nuestros resultados coinciden con los reportes de la literatura que documentan la contribución tanto de nanomateriales como del tandem Glicina-Betaína en la germinación de *Z. mays*. Las semillas de maíz pueden ver afectadas sus características de germinación y su potencial de vigor, bajo condiciones de estrés por sequía (Mahakham et al., 2017) y nuestros resultados sugieren que el tratamiento de las semillas con los compuestos antes mencionados puede llegar a revertir los efectos inhibitorios producidos por dicho estrés.

Nuestros resultados mostraron una falta de respuesta a la adición de nanopartículas en los tratamientos sin estrés en la Fase I.

Los efectos positivos de las nanopartículas de carbono sobre el crecimiento y desarrollo de los cultivos han sido bien documentados (Ali et al., 2020; Martínez-Ballesta et al., 2020). Las diferencias entre nuestros resultados de germinación, en los ensayos sin

estrés de la fase I, con los documentados en condiciones sin estrés, durante la germinación, pudieron ser la consecuencia, de la baja movilidad de las nanopartículas de biocarbón adicionadas, que impidiera que penetraran de una forma adecuada al tejido, teniendo por lo tanto una menor contribución sobre la fisiología del cultivo en general en condiciones de no estrés.

Una explicación similar puede existir para el caso de las especies reactivas de oxígeno evaluadas, donde no se presentaron variaciones por efecto de la adición de nanopartículas en esta fase.

En contraste en condiciones en condiciones de estrés, detectadas en la fase I, durante la fase II se observó una contribución limitada tanto de los nanomateriales de nanocarbón como del tandem Glicina-Betaína en la germinación de *Zea mays*. Sin embargo, durante el desarrollo temprano, en ciertos tratamientos se observaron incrementos significativos en biomasa y una mayor actividad de peróxidos en condiciones de estrés, de deshidrogenasas en las condiciones hídricas y en superóxidos en condiciones de no estrés. Sin embargo, dichos cambios no se pudieron correlacionar con el desarrollo general de la planta.

8.2. Nanomateriales de Ferrita de Magnesio

Se ha documentado la contribución de nanopartículas de ferrita para mejorar la germinación de las semillas (Ali et al., 2020; Yue et al., 2023). Sin embargo, ningún estudio ha explorado aún la contribución de nanopartículas de ferritas dopadas con magnesio solas y asociadas a la Glicina-Betaína en condiciones de estrés hídrico como un mecanismo de protección de la planta. En las condiciones de nuestros ensayos de la fase I, durante la germinación, las nanopartículas de ferrita dopadas con magnesio mostraron junto con los tratamientos añadidos con glicina-betaína sola o la glicina-betaína más la nano ferrita de magnesio tasas de germinación superiores que el tratamiento control. Informes anteriores muestran que el estrés por sequía aumenta la acumulación de glicina-

betaína en las semillas y esta combinación de osmolitos contribuye a la tolerancia de las plantas a la sequía (Annunziata et al., 2019b) . En nuestro estudio los resultados coinciden con los reportes anteriores y, a diferencia de las condiciones sin estrés, durante el estrés hídrico se observaron respuestas estadísticamente significativas en comparación con el control. Nuestros resultados coinciden también con los reportes de la literatura que documentan la contribución tanto de nanomateriales de ferrita durante la germinación. Las semillas de *Z. mays* pueden ver afectadas sus características de germinación y su potencial de vigor bajo condiciones de estrés por sequía (Nesmith & Ritchie, 1992) y la impregnación (Ahmed et al., 2019) de los compuestos antes mencionados pueden llegar a revertirlo.

Además, nuestros resultados sugieren que, durante el crecimiento temprano de *Z. mays* y en condiciones sin estrés, las nanopartículas de ferrita sola presentan tendencia a incrementar la presencia de peróxido y superóxidos en tanto que con estrés solo se vio efecto en un tratamiento con superóxido.

En contraste, en condiciones de estrés durante la fase I, en la fase II se observó una contribución menos marcada tanto de la ferrita dopada como del tandem Glicina-Betaína en la germinación de *Zea mays*. No obstante, los elevados porcentajes de germinación detectados en los nanomateriales conteniendo la ferrita sola, sugieren que la principal contribución en la germinación de *Z. mays* proviene de la ferrita de magnesio.

Además, durante el desarrollo temprano del maíz, en ensayos de la fase II y en condiciones de no estrés se detectó una actividad importante de peróxidos y deshidrogenasas en semillas impregnadas únicamente con Ferrita de Magnesio en tanto que en tratamiento sometidos a déficit hídrico, las nanoferritas solas estimularon la actividad de las deshidrogenasas, finalmente, el hecho de el tandem glicina-betaína solo incrementara la biomasa con respecto al control y tuviera una contribución menor sobre las ROS sugiere que los dos materiales utilizados en el ensayo pueden actuar en distintos procesos de la fisiología de la planta y no necesariamente tener un mismo proceso blanco.

9. CONCLUSIONES

En conclusión, las nanopartículas de carbono pueden contribuir a estimular significativamente la germinación de las semillas de maíz. Sin embargo, dichos materiales no contribuyen a modificar la actividad de las ROS en los tejidos, durante el desarrollo temprano de la planta y aparentemente funcionan en diferentes procesos que el tandem glicina-betaína

Las nanopartículas de ferritas dopadas con magnesio pueden contribuir a estimular significativamente la germinación de las semillas de maíz. Además, dichos materiales generan una mayor respuesta de las ROS, lo que sugiere que la aplicación de estos nanomateriales promueve condiciones favorables para un mejor desarrollo temprano de las plantas. Todo lo anterior indica que las nanoferritas de carbono pueden tener un potencial importante para aplicaciones de nanoagricultura.

10. REFERENCIAS

- Abdelhameed, R. E., Abu-Elsaad, N. I., Latef, A. A. H. A., & Metwally, R. A. (2021). Tracking of zinc ferrite nanoparticle effects on pea (*Pisum sativum* L.) plant growth, pigments, mineral content and arbuscular mycorrhizal colonization. *Plants*, 10(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants10030583>
- Abu-Elsaad, N. I., & Abdel hameed, R. E. (2019). Copper ferrite nanoparticles as nutritive supplement for cucumber plants grown under hydroponic system. *Journal of Plant Nutrition*, 42(14), 1645–1659. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1630428>
- Ahmed, N., Zhang, Y., Yu, H., Gabar, A., Zhou, Y., Li, Z., & Zhang, M. (2019). Seed priming with glycine betaine improve seed germination characteristics and antioxidant capacity of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under water-stress conditions. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(4), 8333–8350. https://doi.org/10.15666/aeer/1704_83338350
- Ahumada, M., Lazurko, C., & Alarcon, E. I. (2019). Fundamental concepts on surface chemistry of nanomaterials. In *Photoactive Inorganic Nanoparticles: Surface Composition and Nanosystem Functionality* (pp. 1–19). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814531-9.00001-4>
- Alejandra Díaz-Dávila, N., Aidé, D., Galindo, S., Adali, D., Castañeda-Facio, O., Para, C., Oliva, A., & Facio, C. (2020, August 2). *Nanopartículas de TiO2: Una revisión TiO2 nanoparticles: A review*.
- Ali, M. H., Sobze, J. M., Pham, T. H., Nadeem, M., Liu, C., Galagedara, L., Cheema, M., & Thomas, R. (2020). Carbon nanotubes improved the germination and vigor of plant species from peatland ecosystem via remodeling the membrane lipidome. *Nanomaterials*, 10(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nano10091852>
- Amaya, J., & Quiroga, W. (2019a). Nanomateriales una clasificación desde sus dimensiones. *Revista Química e Industria*, 7–12.

- Amaya, J., & Quiroga, W. (2019b). *Nanomateriales: Una Clasificación Desde Sus Dimensiones*.
- Annunziata, M. G., Ciarmiello, L. F., Woodrow, P., Dell'aversana, E., & Carillo, P. (2019a). Spatial and temporal profile of glycine betaine accumulation in plants under abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00230>
- Annunziata, M. G., Ciarmiello, L. F., Woodrow, P., Dell'aversana, E., & Carillo, P. (2019b). Spatial and temporal profile of glycine betaine accumulation in plants under abiotic stresses. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00230>
- Aquino, E., Prieto, F., Galán, C. A., González, C. A., Barrado, E., & Medina, J. (2011). *Síntesis Y Caracterización De Ferritas De Cd, Pb Y Mn Vía Hidroquímica. Ferrite Of Cd, Pb And Mn, Synthesis And Characterization Hydrochemical Way*. 78, 78–86.
- Astefanei, A., Núñez, O., & Galceran, M. T. (2015). Characterisation and determination of fullerenes: A critical review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 882, pp. 1–21). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.025>
- Belyavskaya, N. A. (2004). Biological effects due to weak magnetic field on plants. *Advances in Space Research*, 34(7 SPEC. ISS.), 1566–1574. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2004.01.021>
- Çakir, R. (2004). Effect of water stress at different development stages on vegetative and reproductive growth of corn. *Field Crops Research*, 89(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.01.005>
- Cañas, J. E., Cañas, C., Long, M., Nations, S., Vadan, R., Dai, L., Luo, M., Ambikapathi, R., Lee, E. H., & Olszyk, D. (2008). Effects Of Functionalized And Nonfunctionalized Single-Walled Carbon Nanotubes On Root Elongation Of Select Crop Species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1922–1931. <https://doi.org/10.1897/08-117.1>

- Carbonell, M. V., Flórez, M., Martínez, E., & Álvarez, J. (2017). Aportaciones sobre el campo magnético: historia e influencia en sistemas biológicos. *Intropica*. <https://doi.org/10.21676/23897864.2282>
- Cassinoni Ruta, M. A. (2012). Producción de maíz con estrés hídrico provocado en diferentes etapas de desarrollo. *Agrociencia Uruguay*, 16(2), 92–102.
- Chen, C., & Zhang, Y. (2009). *Nanowelded carbon nanotubes* (Professor Dr. Phaedon Avouris & Dres. h. c. K. von K. Professor Dr., Eds.; Springer-Verlag). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-01499-4>
- Chen, H., & Yada, R. (2011). Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 22, Issue 11, pp. 585–594). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.09.004>
- Claassen, M. M., & Shaw, R. H. (1970). Water deficit effects on grain: II Grain components. *Agronomy Journal*, 62, 652–655. <https://acsess.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2134/agronj1970.00021962006200050032x>
- Dimkpa, C. O., Singh, U., Adisa, I. O., Bindraban, P. S., Elmer, W. H., Gardea-Torresdey, J. L., & White, J. C. (2018). Effects of manganese nanoparticle exposure on nutrient acquisition in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/agronomy8090158>
- Doi, A., Matsushima, S., Obata, K., Maeda, R., Kajima, A., & Kobayashi, K. (2014). Preparation of magnesium ferrite by a malic acid complex. *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 122(1428), P8-1. <https://doi.org/10.2109/jcersj2.122.P8-1>
- Faizan, M., Bhat, J. A., Chen, C., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., Ahmad, P., & Yu, F. (2021). Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) induce salt tolerance by improving the antioxidant system and photosynthetic machinery in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 161, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.002>

- Fayaz, M., Sajad Rabani, M., Ahmad Wani, S., & Ahmad Thoker, S. (2020). Nano-agriculture: A Novel Approach in Agriculture. In *Microbiota and Biofertilizers: A Sustainable Continuum for Plant and Soil Health* (pp. 99–122). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48771-3_7
- Fereres, E., & Soriano, M. A. (2007). Deficit irrigation for reducing agricultural water use. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 147–159. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl165>
- Foyer, C. H. (2018). Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 154, pp. 134–142). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003>
- Ganjavi, A. S., Oraei, M., Gohari, G., Akbari, A., & Faramarzi, A. (2021). Glycine betaine functionalized graphene oxide as a new engineering nanoparticle lessens salt stress impacts in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.028>
- García, A. F., & Betancur, L. (2012). *A perspective from the Academy*. <https://doi.org/10.25054/issn.2216-1325>
- Golhani, D. K., Khare, A., Burra, G. K., Jain, V. K., & Rao Mokka, J. (2020). Microbes induced biofabrication of nanoparticles: a review. In *Inorganic and Nano-Metal Chemistry* (Vol. 50, Issue 10, pp. 983–999). Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/24701556.2020.1731539>
- Gómez-Gaete, C. (2014). Nanopartículas Poliméricas: Tecnología Y Aplicaciones Farmacéuticas. *Polímeros. Rev. Farmacol. Chile*, 7(2).
- González-Cortés, N., Silos-Espino, H., Carlos Estrada Cabral, J., Archivaldo Chávez-Muñoz, J., & Tejero Jiménez, L. (2016). *Characteristics and properties of maize (Zea mays L.) grown in native Aguascalientes, Mexico*.

- Guozhong Cao, & Ying Wang. (2004). *NANOSTRUCTURES & NANOMATERIALS Synthesis, Properties, and Applications* (World Scientific P). Imperial College Press 57 Shelton Street Covent Garden London WC2H 9HE. <http://hhud.tvu.edu.vn>
- Gupta, A., Saleh, N. M., Das, R., Landis, R. F., Bigdeli, A., Motamedchaboki, K., Campos, A. R., Pomeroy, K., Mahmoudi, M., & Rotello, V. M. (2017). Synergistic antimicrobial therapy using nanoparticles and antibiotics for the treatment of multidrug-resistant bacterial infection. In *Nano Futures* (Vol. 1, Issue 1). IOP Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1088/2399-1984/aa69fb>
- Ha, N. M. C., Nguyen, T. H., Wang, S. L., & Nguyen, A. D. (2019). Preparation of NPK nanofertilizer based on chitosan nanoparticles and its effect on biophysical characteristics and growth of coffee in green house. *Research on Chemical Intermediates*, 45(1), 51–63. <https://doi.org/10.1007/s11164-018-3630-7>
- Handy, R. D., Henry, T. B., Scown, T. M., Johnston, B. D., & Tyler, C. R. (2008). Manufactured nanoparticles: Their uptake and effects on fish - A mechanistic analysis. In *Ecotoxicology* (Vol. 17, Issue 5, pp. 396–409). <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0205-1>
- Hoseney, R. C., & Faubion, J. M. (1992). *Physical properties of cereal grains. In: Storage of cereal grains and their products.*
- Ilyas, M. Z., Park, H., Baek, Y. S., Sa, K. J., Kim, M. J., & Lee, J. K. (2023). Efficacy of Carbon Nanodots and Manganese Ferrite (MnFe₂O₄) Nanoparticles in Stimulating Growth and Antioxidant Activity in Drought-Stressed Maize Inbred Lines. *Plants*, 12(16). <https://doi.org/10.3390/plants12162922>
- Islam, K., Haque, M., Kumar, A., Hoq, A., Hyder, F., & Hoque, S. M. (2020). Manganese ferrite nanoparticles (MnFe₂O₄): Size dependence for hyperthermia and negative/positive contrast enhancement in MRI. *Nanomaterials*, 10(11), 1–23. <https://doi.org/10.3390/nano10112297>

- Jabir, M. S., Taha, A. A., & Sahib, U. I. (2018). Linalool loaded on glutathione-modified gold nanoparticles: a drug delivery system for a successful antimicrobial therapy. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup2), 345–355. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1457535>
- Jabs, T., Dietrich, R. A., Dangit, J. L., Dietrich, R. A., & Dangl, J. L. (1996). *Initiation of Runaway Cell Death in an Arabidopsis Mutant by Extracellular Superoxide*. <http://science.sciencemag.org/>
- Jackson, P., Raun Jacobsen, N., Baun, A., Birkedal, R., Kühnel, D., Alstrup Jensen, K., Vogel, U., & Wallin, H. (2013). *Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes*. <http://journal.chemistrycentral.com/content/7/1/154>
- Javed, R., Usman, M., Yücesan, B., Zia, M., & Gürel, E. (2017). Effect of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on physiology and steviol glycosides production in micropropagated shoots of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.032>
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. In *Beilstein Journal of Nanotechnology* (Vol. 9, Issue 1, pp. 1050–1074). Beilstein-Institut Zur Forderung der Chemischen Wissenschaften. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
- Joosen, R. V. L., Kodde, J., Willems, L. A. J., Ligterink, W., Van Der Plas, L. H. W., & Hilhorst, H. W. M. (2010). Germinator: A software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis* seed germination. *Plant Journal*, 62(1), 148–159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04116.x>
- Joshi, A., Kaur, S., Dharamvir, K., Nayyar, H., & Verma, G. (2018). Multi-walled carbon nanotubes applied through seed-priming influence early germination, root hair, growth and yield of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(8), 3148–3160. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8818>

- Joshi, A., Kaur, S., Singh, P., Dharamvir, K., Nayyar, H., & Verma, G. (2018). Tracking multi-walled carbon nanotubes inside oat (*Avena sativa* L.) plants and assessing their effect on growth, yield, and mammalian (human) cell viability. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 8(6), 1399–1414. <https://doi.org/10.1007/s13204-018-0801-1>
- Juárez-Cisneros, G., Gómez-Romero, M., de la Cruz, H. R., Campos-García, J., & Villegas, J. (2020). Multi-walled carbon nanotubes produced after forest fires improve germination and development of *Eysenhardtia polystachya*. *PeerJ*, 2020(4). <https://doi.org/10.7717/peerj.8634>
- Ju-Nam, Y., & Lead, J. R. (2008). Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the Total Environment*, 400(1–3), 396–414. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.042>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. In *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 12, Issue 7, pp. 908–931). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Khan, M. N., Mobin, M., Abbas, Z. K., AlMutairi, K. A., & Siddiqui, Z. H. (2017). Role of nanomaterials in plants under challenging environments. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 110, pp. 194–209). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.038>
- Khodakovskaya, M. V., Kim, B. S., Kim, J. N., Alimohammadi, M., Dervishi, E., Mustafa, T., & Cernigla, C. E. (2013). Carbon nanotubes as plant growth regulators: Effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. *Small*, 9(1), 115–123. <https://doi.org/10.1002/smll.201201225>
- Lahiani, M. H., Dervishi, E., Chen, J., Nima, Z., Gaume, A., Biris, A. S., & Khodakovskaya, M. V. (2013). Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(16), 7965–7973. <https://doi.org/10.1021/am402052x>

- Lahiani, M. H., Nima, Z. A., Villagarcia, H., Biris, A. S., & Khodakovskaya, M. V. (2018). Assessment of Effects of the Long-Term Exposure of Agricultural Crops to Carbon Nanotubes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(26), 6654–6662. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01863>
- Lara-Romero, J., Campos-García, J., Dasgupta-Schubert, N., Borjas-García, S., Tiwari, D. K., Paraguay-Delgado, F., Jiménez-Sandoval, S., Alonso-Núñez, G., Gómez-Romero, M., Lindig-Cisneros, R., De la Cruz, H. R., & Villegas, J. A. (2017). Biological effects of carbon nanotubes generated in forest wildfire ecosystems rich in resinous trees on native plants. *PeerJ*, 2017(8). <https://doi.org/10.7717/peerj.3658>
- Li, W. Y., Chen, B. X., Chen, Z. J., Gao, Y. T., Chen, Z., & Liu, J. (2017). Reactive oxygen species generated by NADPH oxidases promote radicle protrusion and root elongation during rice seed germination. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1). <https://doi.org/10.3390/ijms18010110>
- Liu, W. W., Chai, S. P., Mohamed, A. R., & Hashim, U. (2014). Synthesis and characterization of graphene and carbon nanotubes: A review on the past and recent developments. In *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* (Vol. 20, Issue 4, pp. 1171–1185). Korean Society of Industrial Engineering Chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.08.028>
- Llinàs, M. C., & Sánchez-García, D. (2013). *Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina*.
- López-Moreno, M. L., Avilés, L. L., Pérez, N. G., Irizarry, B. Á., Perales, O., Cedeno-Mattei, Y., & Román, F. (2016). Effect of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles on the growth and development of *Lycopersicon lycopersicum* (tomato plants). *Science of the Total Environment*, 550, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.063>
- Maensiri, S., Sangmanee, M., & Wiengmoon, A. (2009). Magnesium ferrite (MgFe₂O₄) nanostructures fabricated by electrospinning. *Nanoscale Research Letters*, 4(3), 221–228. <https://doi.org/10.1007/s11671-008-9229-y>

- Mahakham, W., Sarmah, A. K., Maensiri, S., & Theerakulpisut, P. (2017). Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08669-5>
- Martínez, M. E. (2019). *Contenido De Hierro, Calcio Y Magnesio Durante El Proceso De Producción De Germinados De Lentejas (Lens Culinaris) Bajo Cultivo Aeropónico*.
- Martinez-Ballesta, M. C., Chelbi, N., Lopez-Zaplana, A., & Carvajal, M. (2020). Discerning the mechanism of the multiwalled carbon nanotubes effect on root cell water and nutrient transport. *Plant Physiology and Biochemistry*, 146, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.008>
- Matilla, A. J. (2016). *Desarrollo y germinación de las semillas*. <https://www.researchgate.net/publication/271512205>
- Medina Chanduví, H. H., Gil Rebaza, A. V., & Errico, L. A. (2020). Structural, magnetic and hyperfine properties of the ferrite MgFe_2O_4 : An ab-initio calculations. *Anales de La Asociacion Fisica Argentina*, 31(4), 121–126. <https://doi.org/10.31527/analesafa.2020.31.4.121>
- Medina Mendoza, M., Beltrán Deyanira, A., Martínez Virginia Hidolina, C., & Medina Ricardo, L. (2017). *Nanopartículas de MgFe_2O_4 preparadas por el método del complejo del malato-nitrato activas bajo luz solar Palabras clave MgFe_2O_4 , nanotecnología* Keywords.
- Milinčić, D. D., Popović, D. A., Lević, S. M., Kostić, A. Ž., Tešić, Ž. Lj., Nedović, V. A., & Pešić, M. B. (2019). *Application of Polyphenol-Loaded Nanoparticles in Food Industry*.
- Mukhopadhyay, S. S. (2014). Nanotechnology in agriculture: Prospects and constraints. In *Nanotechnology, Science and Applications* (Vol. 7, Issue 2, pp. 63–71). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/NSA.S39409>

- Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y., & Kumar, D. S. (2010). Nanoparticulate material delivery to plants. In *Plant Science* (Vol. 179, Issue 3, pp. 154–163). <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.012>
- Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 156, Issues 1–2, pp. 1–13). <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.02.001>
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Issaabadi, Z., & Sajjadi, M. (2019). Biological Sources Used in Green Nanotechnology. In *Interface Science and Technology* (Vol. 28, pp. 81–111). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00003-1>
- Nesmith, D. S., & Ritchie, J. T. (1992). *Maize (Zea mays L.) response to a severe soil water-deficit during grain-filling.* [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(92\)90073-I](https://doi.org/10.1016/0378-4290(92)90073-I)
- Noctor, G., Reichheld, J. P., & Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 80, pp. 3–12). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.07.013>
- Oddone, N., Damián, J. P., Tassano, M., Zambrana, A. I., Etchegoimberry, D., Cabral, P., Benech, J. C., & Pi, N. (2012). *Nanociencia, nanotecnología y nanobiología.* 1, 1–157.
- Oliveros Díaz, Mauricio., López, N. D., Hernández, J., Morales, B., & Jimenez, D. (2023). Efecto de la aplicación tópica foliar de magnesio (mg²⁺) quelatado con EDTA, sobre el incremento de la concentración de clorofila (chl) en el cultivo de aguacate persea americana var. HASS. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.802274>
- Ortega, I. S. (2014). Maíz I (*Zea mays*). *Reduca (Biología). Serie Botánica*, 7(2), 151–171.

- Otegui, M. E., Andrade, F. H., & Suero, E. E. (1995). Growth, water use, and kernel abortion of maize subjected to drought at silking. *Field Crops Research*, 40(2), 87–94. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4290\(94\)00093-R](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4290(94)00093-R)
- Paliwal, R. L., Granados, G., Lafitte, H. R., Violic, A. D., & Marathée, J. P. (2001). *EL MAÍZ EN LOS TRÓPICOS: Mejoramiento y producción*.
- Perales, H., & Golicher, D. (2014). Mapping the Diversity of Maize Races in Mexico. *PLoS ONE*, 0(0), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114657>
- Perez, A., Marest, G., Sawicka, B. D., Sawicki, J. A., & Tyliczszak, T. (1983). *Iron-ion-implantation effects in MgO crystals* (Vol. 28).
- Picquart, M. (2009). *Un pequeño paseo por el nanomundo. Razón y Palabra*. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199520297015>
- Qi, J., Song, C. P., Wang, B., Zhou, J., Kangasjärvi, J., Zhu, J. K., & Gong, Z. (2018). Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack. In *Journal of Integrative Plant Biology* (Vol. 60, Issue 9, pp. 805–826). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jipb.12654>
- Raliya, R., Saharan, V., Dimkpa, C., & Biswas, P. (2018). Nanofertilizer for Precision and Sustainable Agriculture: Current State and Future Perspectives. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 66, Issue 26, pp. 6487–6503). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02178>
- Ramírez-Rodríguez, G. B., Miguel-Rojas, C., Montanha, G. S., Carmona, F. J., Dal Sasso, G., Sillero, J. C., Pedersen, J. S., Masciocchi, N., Guagliardi, A., Pérez-De-luque, A., & Delgado-López, J. M. (2020). Reducing nitrogen dosage in triticum durum plants with urea-doped nanofertilizers. *Nanomaterials*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/nano10061043>

- Rivas Martínez, M. J., Román Ganzer, J., & Cosme Huertas, M. Luisa. (2007). *Aplicaciones actuales y futuras de los nanotubos de carbono*. Fundación Madri+d para el Conocimiento.
- Salem, S. S., & Fouda, A. (2011). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: an Overview. *Biological Trace Element Research*, 199, 344–370. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02138-3>/Published
- Schmidt, C., & Storsberg, J. (2015). Nanomaterials-tools, technology and methodology of nanotechnology based biomedical systems for diagnostics and therapy. In *Biomedicines* (Vol. 3, Issue 3, pp. 203–223). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines3030203>
- Schussler, J. R., & Westgate, M. E. (1995). Assimilate Flux Determines Kernel Set at Low Water Potential in Maize. *Crops Science*, 35, 1075–1080.
- Sengupta, A., Kumar, C., & Editors, S. (2015). *Introduction to Nano Basics to Nanoscience and Nanotechnology*. <http://www.springer.com/series/4288>
- Shala, A., & Mahmoud, M. (2018). Influence of Glycinebetaine on Water Stress Tolerance of Hibiscus sabdariffa L. Plant. *Journal of Plant Production*, 9(12), 981–988. <https://doi.org/10.21608/jpp.2018.36615>
- Siddiqui, M. H., Al-Whaibi Firoz, M. H., & Editors, M. (2015). *Nanotechnology and Plant Sciences Nanoparticles and Their Impact on Plants*.
- Sigma-Aldrich. (2024). 755117-BULK ALDRICH. www.sigmaaldrich.com
- Simbine, E. O., Rodrigues, L. da C., Lapa-Guimarães, J., Kamimura, E. S., Corassin, C. H., & de OLIVEIRA, C. A. F. (2019). Application of silver nanoparticles in food packages: A review. In *Food Science and Technology (Brazil)* (Vol. 39, Issue 4, pp. 793–802). Sociedade Brasileira de Ciencia e Tecnologia de Alimentos, SBCTA. <https://doi.org/10.1590/fst.36318>

- Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Mishra, R. K., Tripathi, D. K., Singh, V. P., Chauhan, D. K., & Prasad, S. M. (2016). Reactive oxygen species (ROS): Beneficial companions of plants' developmental processes. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Issue September 2016). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01299>
- Srinivasan, S. Y., Paknikar, K. M., Bodas, D., & Gajbhiye, V. (2018). Applications of cobalt ferrite nanoparticles in biomedical nanotechnology. In *Nanomedicine* (Vol. 13, Issue 10, pp. 1221–1238). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0379>
- Strable, J., & Scanlon, M. J. (2009). Maize (*Zea mays*): A model organism for basic and applied research in plant biology. In *Cold Spring Harbor Protocols* (Vol. 4, Issue 10). <https://doi.org/10.1101/pdb.emo132>
- Streckova, M., Bures, R., Faberova, M., Kurek, P., Roupcova, P., Hadraba, H., Girman, V., & Strecka, J. (2015). A novel composite material designed from FeSi powder and Mn 0.8, Zn 0.2, Fe₂O₄. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/924859>
- Thakur, A., Sharma, N., Bhatti, M., Sharma, M., Trukhanov, A. V., Trukhanov, S. V., Panina, L. V., Astapovich, K. A., & Thakur, P. (2020). Synthesis of barium ferrite nanoparticles using rhizome extract of *Acorus Calamus*: Characterization and its efficacy against different plant phytopathogenic fungi. *Nano-Structures and Nano-Objects*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2020.100599>
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., & Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal*, 11(6), 1187–1194. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11061187.x>
- Tian, H., Ghorbanpour, M., & Kariman, K. (2018). Manganese oxide nanoparticle-induced changes in growth, redox reactions and elicitation of antioxidant metabolites in deadly nightshade (*Atropa belladonna* L.). *Industrial Crops and Products*, 126, 403–414. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.042>

- Tisarum, R., Theerawitaya, C., Samphumphuang, T., Singh, H. P., & Cha-um, S. (2020). Foliar application of glycinebetaine regulates soluble sugars and modulates physiological adaptations in sweet potato (*Ipomoea batatas*) under water deficit. *Protoplasma*, 257(1), 197–211. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01429-4>
- Tiwari, D. K., Dasgupta-Schubert, N., Villaseñor Cendejas, L. M., Villegas, J., Carreto Montoya, L., & Borjas García, S. E. (2014). Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 4(5), 577–591. <https://doi.org/10.1007/s13204-013-0236-7>
- Tombuloglu, H., Tombuloglu, G., Slimani, Y., Ercan, I., Sozeri, H., & Baykal, A. (2018). Impact of manganese ferrite (MnFe_2O_4) nanoparticles on growth and magnetic character of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental Pollution*, 243, 872–881. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.096>
- Tripathi, S., Sonkar, S. K., & Sarkar, S. (2011). Growth stimulation of gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes. *Nanoscale*, 3(3), 1176–1181. <https://doi.org/10.1039/c0nr00722f>
- Ulhassan, Z., Khan, I., Hussain, M., Khan, A. R., Hamid, Y., Hussain, S., Allakhverdiev, S. I., & Zhou, W. (2022). Efficacy of metallic nanoparticles in attenuating the accumulation and toxicity of chromium in plants: Current knowledge and future perspectives. *Environmental Pollution*, 315, 120390. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.120390>
- Valenzuela, R. (1994). *Magnetic ceramics* (Bruce Dunn, John W. Goodby, & A. R. West, Eds.). Library of Congress Cataloguing in Publication data.
- Vázquez-Núñez, E. (2022). Uso de nanomateriales en la agricultura y sus implicaciones ecológicas y ambientales. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 16(30), 1e–25e. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69704>

- Venkatachalam, P., Priyanka, N., Manikandan, K., Ganeshbabu, I., Indiraarulsevi, P., Geetha, N., Muralikrishna, K., Bhattacharya, R. C., Tiwari, M., Sharma, N., & Sahi, S. V. (2017). Enhanced plant growth promoting role of phycomolecules coated zinc oxide nanoparticles with P supplementation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.004>
- Verma, S. K., Das, A. K., Patel, M. K., Shah, A., Kumar, V., & Gantait, S. (2018). Engineered nanomaterials for plant growth and development: A perspective analysis. In *Science of the Total Environment* (Vol. 630, pp. 1413–1435). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.313>
- Virden, A., Wells, S., & O'Grady, K. (2007). Physical and magnetic properties of highly anisotropic cobalt ferrite particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 316(2 SPEC. ISS.), <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2007.03.100>
- Vithanage, M., Seneviratne, M., Ahmad, M., Sarkar, B., & Ok, Y. S. (2017). Contrasting effects of engineered carbon nanotubes on plants: a review. *Environmental Geochemistry and Health*, 39(6), 1421–1439. <https://doi.org/10.1007/s10653-017-9957-y>
- Xiao, J. X., Hu, C. Y., Chen, Y. Y., Yang, B., & Hua, J. (2014). Effects of low magnesium and an arbuscular mycorrhizal fungus on the growth, magnesium distribution and photosynthesis of two citrus cultivars. *Scientia Horticulturae*, 177, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.07.016>
- Yan, Q. L., Gozin, M., Zhao, F. Q., Cohen, A., & Pang, S. P. (2016). Highly energetic compositions based on functionalized carbon nanomaterials. In *Nanoscale* (Vol. 8, Issue 9, pp. 4799–4851). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c5nr07855e>
- Ye, Y., Cota-Ruiz, K., Hernández-Viezcás, J. A., Valdés, C., Medina-Velo, I. A., Turley, R. S., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2020). Manganese Nanoparticles

Control Salinity-Modulated Molecular Responses in *Capsicum annuum* L. Through Priming: A Sustainable Approach for Agriculture. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(3), 1427–1436. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b05615>

Yuan, S. J., & Dai, X. H. (2017). Sewage sludge-based functional nanomaterials: development and applications. *Environmental Science: Nano*, 4(1), 17–26. <https://doi.org/10.1039/c6en00177g>

Yue, L., Xie, B., Cao, X., Chen, F., Wang, C., Xiao, Z., Jiao, L., & Wang, Z. (2023). The Mechanism of Manganese Ferrite Nanomaterials Promoting Drought Resistance in Rice. *Nanomaterials*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/nano13091484>