



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA**

**DEPARTAMENTO DE PLÁSTICOS EN LA AGRICULTURA**

**Efecto del fertilizante fosfatado encapsulado con Poli (ácido- $\gamma$ -glutámico) en el crecimiento radicular de *Arabidopsis thaliana in vitro*.**

Por:

**ING. EN AGROBIOLOGÍA SANTOS EMILIO LAGUNES ZAVALA**

## **TESIS**

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROPLASTICULTURA**

**DIRECTORES**

Dr. José Humberto Valenzuela Soto

Dr. Randy Ortiz Castro

Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México a Noviembre del 2017

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA**  
**Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura**

**TESIS**

**Efecto del fertilizante fosfatado encapsulado con Poli (ácido- $\gamma$ - glutámico) en el crecimiento radicular de *Arabidopsis thaliana in vitro***

**Presentada por:**

**SANTOS EMILIO LAGUNES ZAVALA**

**Para obtener el grado de:**

**Maestro en Ciencias en Agroplasticultura**

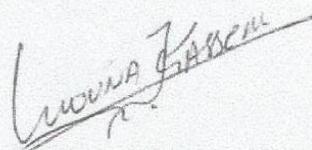
**Asesorado por:**

**Dr. José Humberto Valenzuela Soto**  
**Dr. Randy Ortiz Castro**

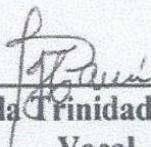
**SINODALES**



**Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández**  
**Presidente**



**Dra. Mona Kassem**  
**Secretario**



**Dra. Hermila Trinidad García Osuna**  
**Vocal**

**Saltillo, Coahuila**

**Noviembre, 2017**

"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

Saltillo, Coahuila a 27 de noviembre de 2017

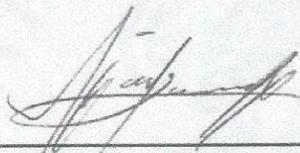
**Coordinación de Posgrado**

**Presente**

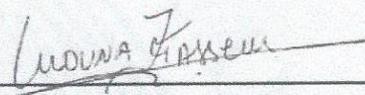
Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por **SANTOS EMILIO LAGUNES ZAVALA** titulado **Efecto del fertilizante fosfatado encapsulado con Poli (ácido-γ- glutámico) en el crecimiento radicular de Arabidopsis thaliana in vitro** el cual fue presentado el día **24 de noviembre de 2017**, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento adjunto corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

**Sinodales**



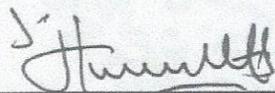
**Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández**  
Presidente



**Dra. Mona Kassem**  
Secretario

**Dra. Hermila Trinidad García Osuna**  
Vocal

**Vo. Bo. De los Asesores**

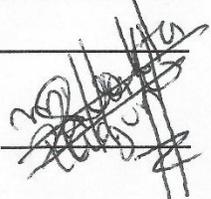


**Dr. José Humberto Valenzuela Soto**

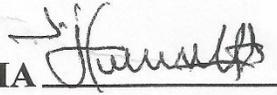
**Dr. Randy Ortiz Castro**

# TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN AGROPLASTICULTURA

AUTOR: SANTOS EMILIO LAGUNES ZA VALETA FIRMA 

TITULO: Efecto del fertilizante fosfatado encapsulado con Poli (ácido- $\gamma$ -glutámico) en el crecimiento radicular de *Arabidopsis thaliana in vitro*.

ASESORES: Dr. José Humberto Valenzuela Soto FIRMA 

Dr. Randy Ortiz Castro

FIRMA 

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 24 de noviembre de 2017



Sello de la Institución

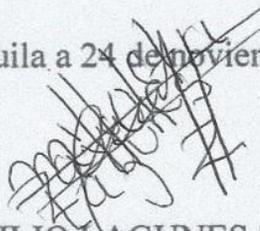


Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández  
Director General del CIQA

## DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 24 de noviembre de 2017



SANTOS EMILIO LAGUNES ZA VALETA

Nombre y Firma

## DEDICATORIA

Este trabajo, fruto de un gran esfuerzo, sudor y lágrimas va dedicado para:

Mi familia

**“Lagunes-Zavaleta”**

Mis papás: **Félix Lagunes López y Natividad Zavaleta Aburto.**

A mis hermanos: **Mari, Pepe y Willy.**

A mis sobrinos: **Ángel Salvador y Maximiliano.**

## AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme el apoyo económico para la realización de esta investigación, así como al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

Asimismo al CONACyT que apoyó este proyecto mediante la Convocatoria de Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales 2014, a través del proyecto No. 248760 "Fertilizantes nanoencapsulados: Una estrategia para garantizar la seguridad alimentaria y mitigar el impacto de la escasez de fósforo". Y al Laboratorio Nacional de Materiales Grafénicos (Proyecto CONACyT No. 281164) por el apoyo en el desarrollo y caracterización de los nanoencapsulados".

A las doctoras: Ana Margarita, Mona y Lluvia de Abril, por su apoyo y disposición para el desarrollo del presente trabajo. Por compartir su experiencia y conocimiento que contribuyeron con mi formación académica, así como formar parte de mi comité sinodal.

Del CIQA al Dr. Jorge Romero, Dr. Antoni Ledesma, Dr. Carlos Espinoza, Técnico QFB. Naty Canché y del INECOL al Dr. Randy Ortiz, Dra. Anahí Pérez, M.C. Benjamín; por el apoyo brindado en las actividades de laboratorio, realizadas durante el presente trabajo.

A mis profesores: Dr. Marco Arellano, Dr. Juan Munguía, Dr. Antonio Cárdenas, Dr. Luis Ibarra, M.C. Luis Villarreal, Dra. Lydia Berlanga, Dr. Marco Castillo (A), M.C. Santiago, Dr. Oussama Mounser, por su dedicación, esmero y apuro en lograr enriquecerme con sus conocimientos adquiridos, siendo el pilar fundamental en mi formación en el posgrado.

A mis amigos la Maestra Gladys de los Santos, por apoyarme siempre y estar dispuesta en todo momento para que este trabajo saliera delante, así como darme su amistad. A Cardeña, Paco y Pénjamo (los podridos), gracias por sus tarugadas que me hacían reír, día a día son unos sonsos (ámenme), a mis compañeros y amigos: Sandra Luz, Oscar, Betty, Dulce, Apolonia, Hernel, Ayatzol y Enrique.

Al Grupo de Becarios CONACYT Sin Censura: a ese grupo de gente inadaptada y futuros Investigadores que no conozco, pero con sus ocurrencias hacían de mí existir con la tesis y en esos momentos de estrés... un bonito lugar para irme a refugiar (son unos loquillos).

Y como siempre les agradezco a mis amigos de siempre Padre Felipe de Jesús y familia, M.C. Raquel Olivas Salazar, Dr. Fernando Ruíz Zárate, Yanira, Sandra, Samanta, Arizbeth, Emilio, Esveidy, Karen, Iris, Yadira, Sara, Adriana, Héctor, Mariana, Elizabeth, Joven Mar, Joven Betty, Comadre (Estefanía), Itzhel Neví, Nayeli y a mis nuevos amigos Burelo, David, Xenia, Samara, Saida, Martha, Gracias por ser parte de mi vida, hoy y siempre.

Pero Sobre todo a mi Dios Padre todo Celestial.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	III
ÍNDICE DE TABLAS .....	V
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
2.1. RELACIÓN SUELO-PLANTA-NUTRIENTES .....	3
2.1.1. <i>Relación suelo-planta</i> .....	3
2.1.2. <i>Relación planta-nutriente</i> .....	3
2.2. CULTIVOS AGRÍCOLAS Y LA RELACIÓN SUELO-PLANTA-NUTRIENTE.....	4
2.2.1. <i>Las alteraciones agrícolas en la relación suelo-planta-nutriente</i> .....	4
2.2.2. <i>Sustitución de nutrientes naturales por nutrientes sintéticos</i> .....	4
2.3. NUEVAS TECNOLOGÍAS Y HERRAMIENTAS, PARA SUBSANAR PROBLEMAS EN LA AGRICULTURA..	8
2.3.1. <i>Usos de la nano y microciencia</i> .....	9
2.3.2. <i>La nano y/o microciencia en los sistemas biológicos</i> .....	10
2.4. ESTUDIOS DE INTERACCIONES ENCAPSULANTE-BIOSISTEMA: FITOTOXICIDAD.....	13
2.4.1. <i>Estudio con nano/micropartículas inorgánicas</i> .....	13
2.5. INNOVAR PARA MEJORAR AL AMBIENTE: PROPUESTA DE SÍNTESIS DE NANO/MICROPARTÍCULAS	
ORGÁNICAS .....	14
2.5.1. <i>Polímeros biodegradables: plan en marcha</i> .....	14
2.5.2. <i>Tipos de polímeros biodegradables</i> .....	14
2.5.3. <i>Polímero biodegradable: Poli (ácido-<math>\gamma</math>-glutámico), candidato a agente</i>	
<i>acarreador</i> .....	15
2.5.4. <i>¿Qué hace al Poli (ácido-<math>\gamma</math>-glutámico) un candidato a agente acarreador?</i> .....	16
2.5.5. <i>Estudios piloto con el Poli (ácido-<math>\gamma</math>-glutámico) como agente acarreador</i> .....	17
2.5.6. <i>Estudios más fiables: uso de cultivo in vitro</i> .....	17
III. JUSTIFICACIÓN.....	21
IV. HIPÓTESIS.....	22
V. OBJETIVOS .....	23
5.1. OBJETIVO GENERAL .....	23
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
6.1. MATERIAL VEGETAL .....	24
6.2. FERTILIZANTE INORGÁNICO .....	24
6.3. POLÍMERO BIOLÓGICO.....	25
6.4. MÉTODOS DE ENCAPSULAMIENTO.....	25
6.5. ESTANDARIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE & SKOOG.....	25
6.6. ANÁLISIS REALIZADOS CON <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	26
6.6.1. <i>Desinfección de las semillas</i> .....	26
6.6.2. <i>Siembra de las semillas de Arabidopsis thaliana</i> .....	26
6.6.3. <i>Evaluación del porcentaje de germinación</i> .....	27

6.6.4.	<i>Evaluación de la longitud radicular</i> .....	27
6.7.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
7.1.	OBTENCIÓN DEL POLÍMERO ORGÁNICO .....	28
7.2.	OBTENCIÓN DE LOS ENCAPSULANTES .....	29
7.3.	ESTANDARIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO .....	29
7.4.	EFFECTO DEL POLI (ÁCIDO- $\gamma$ - GLUTÁMICO) SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	29
7.5.	VELOCIDAD DEL CRECIMIENTO RELATIVO DE LA RAÍZ PRIMARIA DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	35
VIII.	CONCLUSIONES .....	47
IX.	PERSPECTIVAS .....	48
X.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	49
XI.	ANEXO .....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Diferentes estructuras de micro y nanoencapsulados.</b> A) núcleo líquido, B) matriz polimérica y C) sustancia activa en dispersión molecular. ....	10
<b>Figura 2. Estructura polimérica del <math>\gamma</math>-PGA</b> .....	16
<b>Figura 3. Efecto dosis respuesta del <math>\gamma</math>-PGA en la germinación de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b> Semillas de <i>A. thaliana</i> fueron sembradas en medio MS a pH 5.7 y 8, suplementadas con $\gamma$ -PGA y sin polímero en la proporción 1:1 (1 mg de $\gamma$ -PGA/1 mL de agua destilada). Los datos muestran el porcentaje de germinación de 20 semillas por tratamiento.....	31
<b>Figura 4. Efecto dosis respuesta del <math>\gamma</math>-PGA en la germinación de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b> Semillas de <i>A. thaliana</i> fueron sembradas en medios MS a pH 5.7 y suplementadas con $\gamma$ -PGA (0, 0.0125, 0.025, 0.05 g de $\gamma$ -PGA/L de medio MS). Los datos muestran el porcentaje en la germinación de 20 semillas por tratamiento. ....	33
<b>Figura 5. Efecto dosis respuesta de NPs con y sin P en la germinación de la semilla de <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b> Semillas de <i>A. thaliana</i> fueron sembradas en medio MS a pH 5.7, con la concentración de 0.01 mM de P, adicionado con 0, 0.0125, 0.025 y 0.05 g de NPs c/s P/L. Los datos muestran el porcentaje de germinación de 20 semillas de <i>A. thaliana</i> por tratamiento. ....	34
<b>Figura 6. Efecto del <math>\gamma</math>-PGA sobre la velocidad del crecimiento de la raíz primaria de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b> Plantas de <i>A. thaliana</i> fueron crecidas en medio MS ajustados a pH 5.7 y 8, en condiciones de deficiencia de P (0.1 mM) y óptimas de P (1 mM), suplementadas con la proporción 1:1 (1 mg de $\gamma$ -PGA/1 mL de agua destilada) y sin el polímero. Los datos muestran los promedios de la tasa de crecimiento de la raíz primaria en cm/d. n= 20 plantas. Las letras diferentes muestran la diferencia estadística a partir del análisis Tukey p<0.05.....	36
<b>Figura 7. Efecto de la respuesta del P en el crecimiento de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> crecidas en medio MS.</b> A) Arquitectura radicular de <i>A. thaliana</i> crecida en un medio MS con condiciones óptimas de P y B) Arquitectura radicular de <i>A. thaliana</i> crecida en un medio MS con condiciones deficientes de P.....	37
<b>Figura 8. Efecto dosis respuesta del <math>\gamma</math>-PGA en la velocidad de crecimiento relativo de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b> Plántula de <i>A. thaliana</i> fueron crecidas en medio MS en condiciones nulas, deficientes y óptimas de P; las cuales fueron suplementadas con diferentes concentraciones de $\gamma$ -PGA (0, 0.0125, 0.025, 0.05 g de $\gamma$ -PGA/L de MS) los datos muestran los promedios de la tasa de crecimiento de la raíz primaria en cm/d. n= 20 plantas por tratamiento. Las letras diferentes muestran la diferencia estadística a partir del análisis Tukey p<0.05. ....	39
<b>Figura 9. Efecto de la respuesta del <math>\gamma</math>-PGA en el crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b> Fotos representativas del crecimiento de <i>A. thaliana</i> en el medio de cultivo MS con dosis óptima (1 mM de P), pH ajustado a 5.7, añadiendo en el medio $\gamma$ -PGA A) tratamiento control (1 mM de P; sin $\gamma$ -PGA), B) 1 mM de P; 0.05 g de $\gamma$ -PGA/L de MS, C) 1 mM de P; 0.025 g de $\gamma$ -PGA/L de MS y D) 1 mM de P; 0.0125 g de $\gamma$ -PGA/ L de MS. ....	40

**Figura 10. Efecto de la respuesta del  $\gamma$ -PGAp en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.** Fotos representativas del crecimiento de la planta de *A. thaliana* en el medio de cultivo MS con dosis deficiente de P (0.01 mM de P), pH ajustado a 5.7, añadiendo en el medio  $\gamma$ -PGAp A) tratamiento control (0.01 mM de P; sin  $\gamma$ -PGAp), B) 0.01mM de P; 0.05 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS, C) 0.01 mM de P; 0.025 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS y D) 0.01 mM de P; 0.0125 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS. ....41

**Figura 11. Efecto de la respuesta del  $\gamma$ -PGAp en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.** Fotos representativas del crecimiento de la planta de *A. thaliana* en el medio de cultivo MS sin P (nulo; 0 mM de P), pH ajustado a 5.7, añadiendo en el medio  $\gamma$ -PGAp A) tratamiento control (0 mM de P; sin  $\gamma$ -PGAp), B) 0mM de P; 0.05 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS, C) 0 mM de P; 0.025 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS y D) 0 mM de P; 0.0125 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS. ....42

**Figura 12. Efecto de las NPs sobre la velocidad de crecimiento relativo de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*.** Plantas de *A. thaliana* fueron germinadas y crecidas en medios MS en diferentes condiciones de deficiencia de P. Los datos muestran los promedios de la tasa de crecimiento de la raíz primara en cm/d. n= 20 plantas por tratamiento. Las letras diferentes muestran la diferencia estadística a partir del análisis Tukey p<0.05. ....43

**Figura 13. Efecto de las  $\mu$ Ps sobre la velocidad de crecimiento relativo de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*.** Plantas de *A. thaliana* fueron germinadas y crecidas en medios MS en condiciones de deficiencia (0.01 mM de P) y ajustado a pH 5.7 suplementadas con  $\mu$ Ps c/P (0, 0.06, 0.13, 0.27 g de  $\mu$ Ps c/P/L de MS). Los promedios de la tasa de crecimiento de la raíz primara en cm/d. n= 20 plantas por tratamiento. Las letras diferentes muestran la diferencia estadística a partir del análisis Tukey p<0.05. ....44

**Figura 14. Efecto de las  $\mu$ Ps en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.** Fotografía representativa del crecimiento *in vitro* de plantas de *A. thaliana* en medio MS suplementado con 0, 0.06, 0.13 y 0.27 g de  $\mu$ Ps/L de MS. Se puede observar clorosis generalizada en las plantas. ....45

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos y cantidades a utilizar por litro de agua destilada para la elaboración del medio de cultivo líquido donde se inoculará la bacteria <i>Bacillus licheniformis</i> . .....	59
Tabla 2. Condiciones operacionales. ....	63
Tabla 3. Medio MS modificado para el crecimiento de la <i>A. thalassiana in vitro</i> . .....	64
Tabla 4. Comportamiento del estado físico (pH y solidez) del medio de cultivo MS al ser sometido a diferentes concentraciones de $\gamma$ -PGAp: agua destilada, en diferentes formas de aplicación a pH 5.7 y 8. ....	64

## I. INTRODUCCIÓN

Las plantas crecen y se desarrollan en condiciones naturales en el suelo, donde éste le suministra el agua, el oxígeno y todos los nutrientes que requiere (macro y micronutrientes); siendo también el soporte para las raíces. No obstante, con la introducción de los cultivos agrícolas intensivos, pronto se asoció la falta de nutrientes en el suelo, la pérdida de materia orgánica, la retención hídrica y en conjunto, la disminución en la actividad biológica y por supuesto, limitando los rendimientos en el cultivo (Sinergia, 2003; Olivares-Pascual, 2015).

Por lo anterior y en consecuencia a las actividades agrícolas, el uso de fertilizantes inorgánicos se ha vuelto indispensable, para subsanar la deficiencia de los nutrientes en el suelo y así, aumentar los rendimientos de producción (Gavi-Reyes, 2001). Asimismo, el uso desmedido de fertilizantes inorgánicos en el suelo como son: nitrógeno, fósforo y potasio, han ocasionado daños severos al ambiente, teniendo como repercusión la contaminación del suelo y los mantos acuíferos (sobre todo del fósforo) (Elizondo-Salazar, 2007; Banco Mundial, 2015; Gaucín *et al.*, 2016).

Aunado a los problemas ambientales, la industria agrícola se ha dado a la tarea de buscar e innovar estrategias para obtener una mayor seguridad en el consumo de los alimentos y proteger al medio ambiente, apoyándose así de la nanociencia y microciencia, la cual ha introducido gamas de plaguicidas, reguladores de crecimiento vegetal y fertilizantes químicos menos tóxicos que los usados cotidianamente (Foldori e Invernizzi, 2008; Carrillo-Freire, 2015; Cartelle y

Zurita, 2015). Es por ello, que el formular nuevos fertilizantes con sustancias de origen natural ha sido necesario (Foldori e Invernizzi, 2008). Lo que abre pauta a los polímeros biodegradables, que puedan usarse como micro o nano partículas y representa una buena alternativa que deben ser empleadas, debido a que, se descomponen en sustancias simples gracias a la actividad enzimática de los microorganismos (Manterello *et al.*, 2014).

Dentro de estos polímeros biodegradables se encuentra el poli (ácido- $\gamma$ -glutámico), el cual es extraído de la bacteria *Bacillus licheniformis* (Akagi *et al.*, 2005), siendo un material no tóxico para los seres vivos y el medio ambiente, estas características lo hace buen candidato para diversas aplicaciones, como por ejemplo su uso en la agricultura (Bajaj y Singhal, 2011).

Lo que significaría que se deben realizar pruebas con estas moléculas a partir de formulaciones específicas, en condiciones controlados (ambiente, requerimientos hídricos y nutrición) para estudiar diversos parámetros en el crecimiento vegetal (raíz, hoja, tallo), por ende se deben emplear ensayos en cultivo *in vitro*, el cual ha sido ampliamente utilizado para este tipo de estudios (Recasens, 2008).

Por tal razón y para elaborar nuevos conocimientos científicos, es mejor utilizar organismos modelos de estudio, como el caso de *Arabidopsis thaliana*, del cual se conocen la mayoría de sus mecanismos en el crecimiento y desarrollo *in vitro* y desarrollando estos estudios se podrán conocer mucho mejor el funcionamiento de estos mecanismos (Cuesta-Moliner y Cires-Rodríguez, 2012).

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1. Relación suelo-planta-nutrientes**

#### **2.1.1. Relación suelo-planta**

Las plantas crecen y se desarrollan en condiciones naturales en el suelo, donde éste le suministra el agua, el oxígeno y todos los nutrientes que requiere, siendo también el soporte para las raíces, pero a su vez, la vegetación proporciona protección al suelo, ya que amortigua el impacto de las gotas de lluvia sobre los terrones evitando su dispersión y las raíces le ayudan a disminuir el arrastre por el agua y el aire. Así pues, realizan interacciones bióticas entre el suelo y la planta (López-Bucio *et al.*, 2003; SAGARPA, 2012; FAO, 2015; Olivares-Pascual, 2015).

#### **2.1.2. Relación planta-nutriente**

Según se ha citado por, Tjalling-Howerda (2006), dichos nutrientes que la planta requiere para su óptimo crecimiento y desarrollo, son clasificados en: macronutrientes: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S); que son aquellos que la planta necesita en grandes cantidades y micronutrientes: hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), boro (B), molibdeno (Mo), cloro (Cl) y silicio (Si); que son aquellos que la planta necesita en menores cantidades, pero que de igual manera deben estar presentes en la nutrición de las plantas.

##### **2.1.2.1. Consideraciones de los nutrientes**

En el orden de las ideas anteriores, los macro y micronutrientes, tienen diversas funciones específicas en el metabolismo de la planta y su deficiencia presenta síntomas específicos, por lo tanto cabe mencionar que estos nutrientes no pueden ser reemplazados por ningún otro (Maldonado, 2013).

## **2.2. Cultivos agrícolas y la relación suelo-planta-nutriente**

### **2.2.1. Las alteraciones agrícolas en la relación suelo-planta-nutriente**

Con la introducción de los cultivos agrícolas intensivos, pronto fueron asociadas la falta de nutrientes en el suelo, la pérdida de materia orgánica, la retención hídrica y en conjunto, la disminución en la actividad biológica (Sinergia, 2003). Con estos hechos se comenzó a observar la aparición de ciertos síntomas específicos en la zona aérea de la planta, tal como: amarillamiento, enanismo y por supuesto, limitando los rendimientos en el cultivo (Olivares-Pascual, 2015). De acuerdo con los razonamientos que se han venido realizando, es evidente que al ser afectado la nutrición del suelo, estos síntomas de deficiencia se van a presentar en la zona aérea de la planta (tallos, hojas y flor), pero la responsable de absorber dichos nutrientes es la raíz y estos cambios tan drásticos (deficiencia nutricional), afectan la arquitectura radicular, presentando disminución en la división celular de la raíz, formación de raíces laterales y la formación de pelos radiculares (López-Bucio *et al.*, 2003).

### **2.2.2. Sustitución de nutrientes naturales por nutrientes sintéticos**

La mayor consecuencia de las actividades agrícolas, es el uso de fertilizantes inorgánicos, el cual se ha vuelto indispensable para subsanar la

deficiencia de los nutrientes en el suelo y así, aumentar los rendimientos de producción y la cantidad que se esperan (Gavi-Reyes, 2001). Así pues, han surgido numerosos productos que ofrecen una gran variedad de contenido de nutrientes, para llevar un buen manejo nutrimental en los sistemas agrícolas de producción, el cual está enfocado a la obtención de altos rendimientos por unidad de superficie, tanto a cielo abierto, como en los sistemas de agricultura protegida (Melgar, 2012; Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2014).

#### **2.2.2.1. Sucesión de los nutrientes sintéticos (fertilizantes inorgánicos), ¿Qué cantidad se debe utilizar?**

Para saber cómo llevar un buen manejo nutricional en los sistemas agrícolas, se debe tener en cuenta que los cultivos necesitan cantidades específicas de nutrientes; aparte, es directamente proporcional ya que, dependiendo de la cantidad necesaria, depende del rendimiento obtenido o esperado (FAO, 2002). Según se ha citado, de estos nutrientes aquellos que tienen mayor relevancia por el necesario uso en el crecimiento y desarrollo de la planta traducido en producción, son los macronutrientes, sobre todo los del grupo llamado “nutrientes primarios”, como son el N, P y K (FAO, 2002).

#### **2.2.2.2. Ventaja de los fertilizantes inorgánicos: nitrógeno, potasio y fósforo**

Precisando de una vez, que el N es el motor del crecimiento de la planta, el cual provee del 1 al 4% del extracto seco de la planta, siendo constituyente esencial de las proteínas las cuales son involucradas en todos los procesos

principales de desarrollo. Por otra parte, el K provee del 1 al 4% del extracto seco de la planta, jugando un papel importante como activador de más de 60 enzimas indispensables para la vida de la planta. Por último, el P suple del 0.1 al 0.4% del extracto seco de la planta, jugando un papel importante en la transferencia de energía, así como en la fotosíntesis y otros procesos químico-fisiológicos (Kreji *et al.*, 1999; Gavi-Reyes, 2001; FAO, 2002; Tjalling-Holwerda, 2006).

### **2.2.2.3. Fertilizantes inorgánicos y su comportamiento en el suelo**

Epstein y Bloom (2005) y, Zapata y Roy (2007), mencionan que cuando se aplican al suelo estos fertilizantes primarios disueltos en agua reaccionan rápidamente, pero en el caso del P, resulta ser menos soluble y éste es absorbido sobre las partículas coloidales del suelo. Lo que significa que sólo una pequeña concentración de P es la que se encuentre en la solución del suelo. Provocando la baja movilidad del P en el suelo (aproximadamente 0.1 m al año) y esto provoque que el P no se encuentre disponible para la planta (Zamudio-González *et al.*, 2011).

### **2.2.2.4. Uso del fósforo en la agricultura**

Hechas las consideraciones anteriores del P, su uso se ha incrementado, tal y como lo menciona el Banco Mundial (2015), quien recalca que en México desde el 2002 al 2014, se ha incrementado considerablemente de un 65.3 a 83.6 Kg/Ha respectivamente. Otros datos muestran, que en México, durante el periodo del 2000 al 2007, la demanda del fertilizante fue de 1.4 millones de toneladas

anuales y del 2008 al 2014, aumentó a 2.27 millones de toneladas anuales (Gaucín *et al.*, 2016).

#### **2.2.2.5. ¿Se agota?, el fósforo un recurso valioso**

En este propósito, la demanda exorbitante de este fertilizante es alarmante ya que, el P es un recurso no renovable y varios autores han augurado que las reservas llegaran a su punto máximo en cuando menos 25 años (Urbina-León *et al.*, 2016). Esta situación representa un problema mundial urgente que obliga a la sociedad a poner especial énfasis en su uso y disponibilidad para las futuras generaciones, a razón de esto y de acuerdo a las proyecciones que dictan que la población mundial actual de 7 mil millones de personas (MMp), alcanzarían unos 8 MMp al 2020 y unos 9.4 MMp al 2050. En efecto son datos muy alarmantes, ya que las tierras cultivables tendrían que aumentar su área productiva, haciendo un uso más elevado de este nutriente tan valioso para los seres vivos en general (Elizondo-Salazar, 2007; Zapata y Roy, 2007; Urbina-León *et al.*, 2016).

Es evidente entonces que, esto causará afectaciones al ambiente, puesto que el uso desmedido del fertilizante (P) y su poca movilidad en el suelo, trae como consecuencia elevados índices de salinidad, provocando contaminación del suelo, al agua y a las propias plantas; dañando así, a los ecosistemas, a los animales y a los seres humanos (Zamudio-González *et al.*, 2011; Gaucín *et al.*, 2016; Méndez-Arguello *et al.*, 2016).

### **2.3. Nuevas tecnologías y herramientas, para subsanar problemas en la agricultura**

Aunado a los problemas ambientales, la industria agrícola se ha dado a la tarea de buscar e innovar estrategias para obtener una mayor seguridad en el consumo de los alimentos y proteger al medio ambiente, apoyándose así de la nanociencia y microciencia, la cual ha introducido gamas de plaguicidas, reguladores de crecimiento vegetal y fertilizantes químicos menos tóxicos que los usados cotidianamente (convencionales), haciendo uso de esta valiosa herramienta para la conservación, protección y saneamiento del medio ambiente, así como, para el tratamiento de enfermedades y la obtención de alimentos con alto valor nutricional (Foldori e Invernizzi, 2008; Carrillo-Freire, 2015; Cartelle y Zurita, 2015).

Cabe agregar que la nano y microciencia, se encargan del estudio de los fenómenos y la manipulación del sistema físico a escala micrométrica y/o nanométrica, para obtener información significativa acerca de sus propiedades, las cuales pueden diferir completamente a nivel macroscópico (Gutiérrez-López, 2009; Negrón-Ríos, 2015).

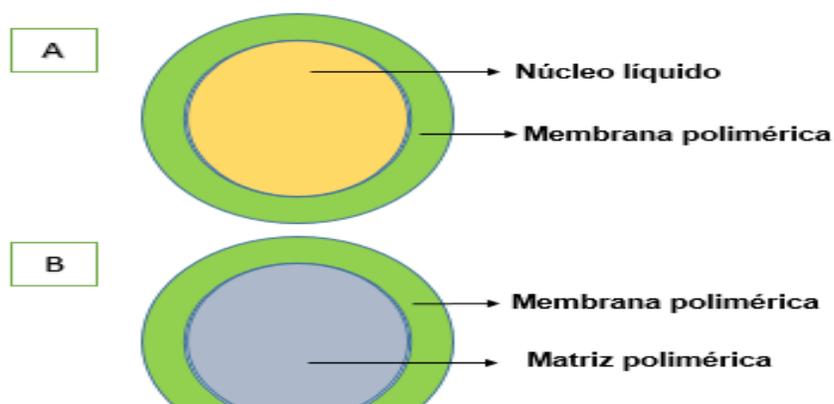
En este mismo sentido, los micro y/o nanomateriales se definen como partículas coloidales sólidas (polvos), que incluyen las micro y/o nanoesferas y las micro y/o nanocápsulas (las cuales se pueden preparar por métodos de polimerización y de síntesis con polímeros preformados). Una de sus características fundamentales es su tamaño. Las nanopartículas (NPs) son de

alrededor de los 0.5 nm a 100 nm, mientras que las micropartículas ( $\mu$ Ps) presentan un tamaño alrededor de 0.1  $\mu$ m a 1 mm y que han sido diseñados para diversas aplicaciones específicas (Mora-Huertas *et al.*, 2009; Negrón-Ríos, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

### 2.3.1. Usos de la nano y microciencia

Dadas las condiciones que anteceden el uso de la micro y/o nanotecnología en diferentes ámbitos (farmacéutica, médica, industrial, etc.), ha cobrado realce durante las últimas décadas, debido a la posibilidad de encapsular moléculas y desarrollar formulaciones de liberación controlada, mejorando las propiedades del principio activo y reduciendo sus efectos adversos (Miranda-Tassara *et al.*, 2014).

En relación con esto último, el concepto de encapsulación se ha fundamentado en la incorporación de una matriz polimérica, la cual forma un ambiente capaz de controlar su interacción con el exterior (Figura 1; Lupo-Pasin *et al.*, 2012; Miranda-Tassara *et al.*, 2014), cabe agregar que pueden servir como “balas mágicas” liberando: herbicidas, fertilizantes que contienen nanopesticidas o, bien, ácidos nucleicos que se dirigen a orgánulos celulares específicos en plantas, animales o humanos para liberar su contenido (Siddiqui *et al.*, 2015).



**Figura 1. Diferentes estructuras de micro y nanoencapsulados.** A) núcleo líquido, B) matriz polimérica y C) sustancia activa en dispersión molecular (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

#### **2.3.1.1. Capsula: Material acarreador**

Entre los materiales que sirven como agente acarreador o encapsulante se encuentran algunos carbohidratos, lípidos, proteínas y polímeros; mientras que los agentes activos o encapsulados pueden ser: sabores, antibióticos, colores, vitaminas, minerales, microorganismos entre otros (Guevara-Bretón y Jiménez-Munguía, 2008). Y se han llegado a formular partículas con estructuras que puede ser tan importante para la eficacia de portadores de liberación de fármaco, la composición química (poliéster, poli anhídrido, poliamida), estabilidad de la columna vertebral (biodegradable, no-biodegradable) y solubilidad en agua (hidrofóbicas e hidrofílicas; Goldberg *et al.*, 2012).

#### **2.3.2. La nano y/o microciencia en los sistemas biológicos**

Todo lo anterior, hace evidente entonces que la aparición de la nano y microciencia, el desarrollo de nuevos dispositivos y materiales, están abriendo nuevas aplicaciones potenciales en la biotecnología y otras áreas; siendo así, la agricultura la segunda área de aplicación de la nanotecnología después de la energética, donde se han aportado nuevas ideas que llevarían a entender la

elucidación adecuada de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de las  $\mu$ Ps y NPs y, conducir mejores estudio en el crecimiento y desarrollo por acción de éstas en las plantas y, en muchos sentidos la de mayor alcance en lo referente a la alta tecnología para los alimentos frescos (Carrillo-González y González-Chavez, 2009; Grucere, 2012; Esparza-Rivera, 2015; Siddiqui *et al.*, 2015).

#### **2.3.2.1. Herramientas de nano escala en la agricultura. ¿sustituto de los fertilizantes inorgánicos?**

Precisando de una vez que, a estos encapsulantes ( $\mu$ Ps y NPs) en el uso agrícola se les conoce como micro/nano-agroquímicos o fertilizantes de liberación lenta o controlada, los cuales actúan liberando su contenido en condiciones controladas, bajo tasas específicas como por ejemplo: la temperatura del suelo (Nolasco-Bethencourt *et al.*, 2005; Recasens, 2008; Reis *et al.*, 2014; Hernández-Frutis, 2015).

#### **2.3.2.2. Interacción biosistema-encapsulante: ¿sustituyendo la relación planta-nutriente?**

Dichos fertilizantes de acción lenta o controlada aportan nutrientes de forma más eficaz y prolongada en el tiempo, aumentando el metabolismo de las plantas e interactúan con ellas causando muchos cambios morfológicos (crecimiento vegetativo), fisiológicos (diferenciación y desarrollo, la inactividad de la senescencia, la abscisión, floración y maduración de los frutos y la productividad ecológica) y, haciendo también frente a las infecciones fitopatológicas, generando

especies reactivas de oxígeno y afectando la peroxidación de lípidos. Este último tiene efecto bioquímico y molecular significativo en la membrana de células más susceptibles al estrés osmótico y su fluidez por la falta de absorción de nutrientes dependiendo de estas propiedades y de la eficiencia (Siddiqui *et al.*, 2015; Thul y Sarangi, 2015). Lo cual es determinado por su composición química (Siddiqui *et al.*, 2015), permitiendo disminuir considerablemente el uso de agroquímicos al aprovechar su tamaño y mayor superficie de contacto y limitar las pérdidas de nutrientes; evitando así el exceso o defecto de los mismos (Nolasco-Bethencourt *et al.*, 2005; Lugo-Medina *et al.*, 2010; Berros y Peiteado, 2015).

#### **2.3.2.3. Cinética de la nueva relación biosistema-encapsulante**

Para que las consideraciones anteriores resulten, estos materiales deben estar en contacto y provocar un efecto en el biosistema. La vía de admisión puede ser: 1) directamente al suelo, 2) como biosólidos tratados en plantas de tratamiento de aguas residuales o bien, 3) por pulverización. En este contexto los micro/nano-agroquímicos necesitan ser diseñados de tal manera que se obtenga una concentración eficaz (con alta solubilidad, estabilidad y eficacia), de liberación controlada del tiempo en respuesta a ciertos estímulos, así como, la actividad específica mejorada y menor toxicidad (Thul y Sarangi, 2015).

##### **2.3.2.3.1. Dinámica del encapsulante con la raíz**

Sobre la base de las consideraciones anteriores y para el caso de la exposición de raíces, los nanomateriales deben penetrar la epidermis de la raíz y

la endodermis, entrando en el vaso del xilema y luego ser transportados a las partes aéreas (Zhang *et al.*, 2015).

## **2.4. Estudios de interacciones encapsulante-biosistema: fitotoxicidad**

En ese mismo sentido, los primeros estudios de las interacciones planta- $\mu$ Ps/NPs se centraron principalmente en la fitotoxicología. Sobre la base de estas consideraciones, la fitotoxicidad de las  $\mu$ Ps/NPs ha demostrado que, difiere en función del tipo de micro- y/o nanomateriales y las especies de plantas. Los ensayos de fitotoxicidad se realizan generalmente en dos etapas de desarrollo de las plantas: 1) durante la germinación (cuando se miden la tasa de germinación y elongación de las raíces) y, 2) durante el crecimiento de las plántulas (en la que se mide la relación de elongación la raíz/ brote y el peso seco); éstas se utilizan con frecuencia para evaluar efectos de la exposición (Zhang *et al.*, 2015).

### **2.4.1. Estudio con nano/micropartículas inorgánicas**

Se ha informado que la germinación de varios cultivos ha mejorado por el uso de  $\mu$ Ps como es el caso de la aplicación de dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) en el maíz y tomate (Suriyaprabha *et al.*, 2012a, b; Siddiqui y Al-Whaibi, 2014), también por el uso de nanotubos en tomate, tabaco, frijol y arroz (Khodakovskaya *et al.*, 2009; Ghodake *et al.*, 2010 Nair *et al.*, 2010); dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) en espinaca y trigo (Zheng *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2005; Yang y Watts, 2005; Yang *et al.*, 2006; Lei *et al.*, 2008; Feizi *et al.*, 2012; Larue *et al.*, 2012), trióxido de aluminio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) en *A. thaliana* y *Lemna minor* (Lee *et al.*, 2010; Juhel *et al.*, 2011); NPs de Si, Cu, plomo (Pb) y oro (Au) en lechuga (Shah y Belozeroва, 2009).

## **2.5. Innovar para mejorar al ambiente: propuesta de síntesis de nano/micropartículas orgánicas**

Por lo anterior, resulta oportuno mencionar que ha resultado necesario innovar el desarrollo de nuevos fertilizantes con sustancias de origen natural (Foldori e Invernizzi, 2008). Todo lo anterior, porque a medida que pasa el tiempo y de las consideraciones anteriores, esas  $\mu$ Ps/NPs se encuentran más frecuente en productos médicos y de consumo, así como en aplicaciones industriales y agrícolas; haciendo que la producción intensiva, el uso y disposición de los desechos que contienen  $\mu$ Ps/NPs diseñadas, aumentan la probabilidad de emisión de este tipo de productos para el medio ambiente (Rico *et al.*, 2015) y en pocos años se puede convertir en un problema ecotoxicológico que puede ocasionar riesgos para la salud del hombre y de otras especies (Hernández-Frutis, 2015).

### **2.5.1. Polímeros biodegradables: plan en marcha**

Por tal motivo, el uso de polímeros biodegradables (PBDs) que puedan usarse como  $\mu$ Ps/NPs, representa una buena alternativa que deben ser empleadas, ya que, se descomponen en sustancias simples gracias a la actividad enzimática de los microorganismos (Manterello *et al.*, 2014). Así pues, las  $\mu$ Ps/NPs de PBDs comprenden tres grandes categorías a saber: 1) los biopolímeros basados en proteínas, 2) biopolímeros sintetizados a partir de monómeros y 3) biopolímeros producidos naturalmente por microorganismos (Cartelle y Zurita, 2015).

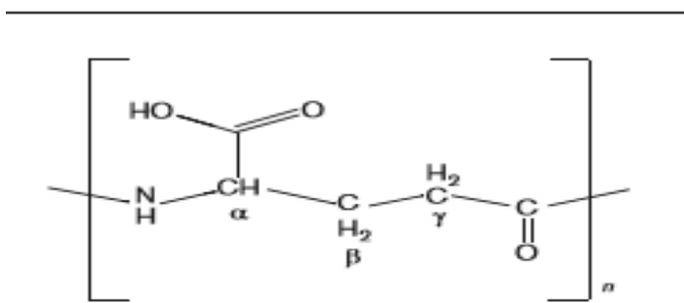
### **2.5.2. Tipos de polímeros biodegradables**

En ese mismo sentido, Cartelle y Zurita (2015), mencionan que los polímeros que constituyen parte de los seres vivos (origen natural) se están estudiando intensamente, hecha la observación anterior se dan ejemplos de algunos de estos polímeros:

1. Biopolímeros basados en proteínas, tales como: el colágeno (proteína de origen animal), gluten del trigo, zeína del maíz, almidón, queratina, quitosán, etc.,
2. Biopolímeros sintetizados a partir de monómeros, por ejemplo: el timol y el ácido poliláctico (PLA). Este último también es un monómero producido naturalmente por la actividad fermentativa bacteriana.
3. Biopolímeros obtenidos de la actividad fermentativa, la celulosa y el xantano, por mencionar algunos.

### 2.5.3. Polímero biodegradable: Poli (ácido- $\gamma$ -glutámico), candidato a agente acarreador

Resulta oportuno señalar que dentro de estos PBDs obtenidos de la actividad fermentativa se encuentra el poli (ácido- $\gamma$ -glutámico;  $\gamma$ -PGA; Figura 2), el cual es extraído de la bacteria *Bacillus licheniformis* CCRC 12826 (Akagi *et al.*, 2005), del cual se tienen reportes que es comestible, no tóxico para los seres vivos y el medio ambiente. Por lo tanto, se ha sugerido como buen candidato para diversas aplicaciones (Bajaj y Singhal, 2011), entre ellas la agricultura (Rico *et al.*, 2015).



**Figura 2. Estructura polimérica del  $\gamma$ -PGA (Ogunleye *et al.*, 2014)**

#### **2.5.4. ¿Qué hace al Poli (ácido- $\gamma$ -glutámico) un candidato a agente acarreador?**

En el orden de las ideas anteriores, resulta oportuno mencionar que estos poliaminoácidos son poliamidas compuestas de un solo aminoácido, dicha referencia, hace que se diferencie de las proteínas, puesto que la proteína se compone de una variedad de aminoácidos y el poliaminoácido se compone de un solo tipo de aminoácido (por lo menos en su columna). En ese sentido cabe mencionar que, hay tres diferentes tipos de poliaminoácidos presentes en la naturaleza: el  $\gamma$ -PGA, Poli- $\epsilon$ -lisina ( $\epsilon$ -PL) y la cianoficina (Bajaj y Singhal, 2011).

En los marcos de las observaciones anteriores, el  $\gamma$ -PGA está compuesto de unidades de ácido-L-glutámico y ácido-D-glutámico, ambos  $\gamma$ -PGA y tiene diferentes propiedades químicas (estados conformacionales, enantiómeros y propiedades de masa molecular), utilizándose con éxito en las industrias de alimentos, médicas y de aguas residuales. En efecto, al crear aplicaciones novedosas; este material tiene el potencial para ser utilizado como un polímero vector de productos para suministro de agentes más inocuo (Akagi *et al.*, 2005; Ogunleye *et al.*, 2014).

### **2.5.5. Estudios piloto con el Poli (ácido- $\gamma$ -glutámico) como agente acarreador**

Con referencia a lo anterior, diversos estudios se han llevado a cabo, Akagi *et al.* (2005), quienes utilizaron preparaciones de  $\mu$ Ps biodegradables basadas en  $\gamma$ -PGA con L-fenilalanina como un polímero acarreador. Pereira *et al.* (2016), quienes realizaron ensayos con semillas de *Phaseolus vulgaris*, añadiendo NPs de  $\gamma$ -PGA puro-quitosán-ácido giberélico ( $\gamma$ -PGAp/CS+GA<sub>3</sub>), mostró alta actividad biológica, aumentando la tasa de germinación en el primer día (50-70%), en comparación con GA<sub>3</sub> libre (10-16%). Estas NPs  $\gamma$ -PGAp/CS+GA<sub>3</sub> fueron más eficientes que la hormona libre, en el aumento del área foliar y la inducción del desarrollo radicular (incluyendo la formación de las raíces laterales). Estos efectos no se observaron cuando las semillas se trataron con NPs  $\gamma$ -PGAp/CS sin GA<sub>3</sub>. Los resultados demostraron el considerable potencial de NPs  $\gamma$ -PGAp/CS+GA<sub>3</sub> en el uso en agricultura.

Los ejemplos anteriormente descritos, donde usaron NPs  $\gamma$ -PGAp, señalan el gran potencial de este polímero para el uso de la agricultura, pero cabe mencionar que, dependiendo de la planta que se quiera cultivar o mantener, se escoge el agente (antimicótico, regulador de crecimiento o fertilizante), para que se libere de forma controlada, siguiendo el patrón de crecimiento o de absorción de nutrientes de la planta, proporcionándole a lo largo del ciclo de cultivo toda la cantidad necesaria de elementos que requiera (Recasens, 2008).

### **2.5.6. Estudios más fiables: uso de cultivo *in vitro***

Por lo anterior, se debe hacer un gasto de materiales, tiempo, esfuerzo traducido en mayor inversión monetaria (Ramírez-Malagón *et al.*, 2007), por ende, para estudiar dichos parámetros en el crecimiento vegetal y tener un sistema más controlado, sin necesidad de estar añadiendo elemento, una y otra vez, se deben realizar experimentos *in vitro*, los cuales son ampliamente utilizados para el estudio de la cinética de liberación de moléculas a partir de formulaciones semisólidas (Recasens, 2008).

#### **2.5.6.1. ¿Qué es el cultivo *in vitro*?**

Precisando de una vez, que el cultivo *in vitro*, es una técnica biotecnológica de propagación vegetal, donde se trabaja con un medio de cultivo el cual tiene los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo vegetativo de una planta, en el que se trabaja con un ambiente controlado CO<sub>2</sub>, humedad relativa, temperatura y fotoperiodo; por lo que no se ve afectado por las épocas del año (Olivera-Ortega *et a.*, 2000; Domínguez- Rosales *et al.*, 2008; Mroginski *et al.*, 2010).

#### **2.5.6.2. Ensayos de liberación en el cultivo *in vitro***

En experimentos *in vitro* se planean celdas de liberación. Un ejemplo de estas son las celdas de difusión de Franz, ésta es la más apropiada para la determinación de la cinética de liberación del principio activo dentro del sistemas por la vía tópica y transdérmica. Estos procedimientos registran la liberación de fármacos y miden sólo aquellas interacciones del principio activo-vehículo que afectan las características de liberación (Mantellero *et al.*, 2014), también se utilizan plantas modelo de estudio, para observar un efecto más marcado en el

comportamiento de su morfología y fisiología (López- Bucio *et al.*, 2007; Cuesta-Moliner y Cires-Rodríguez, 2012).

#### **2.5.6.3. Uso de plantas modelo de estudio en el cultivo *in vitro*: indicador fitotoxicológico**

Dadas las condiciones que anteceden, en donde la interacción planta-NPs/ $\mu$ Ps, el efecto que se produzca va a diferir entre las distintas especies de plantas, dado a razón del material vegetal como haya sido pretratado (en caso de semilla) o colectado (en caso de muestras vegetales; explantes). Así pues, la capacidad de las plantas para responder adecuadamente a la disponibilidad de los nutrientes es de importancia fundamental para su adaptación. Es por esto que, diferentes ensayos han demostrado que la respuesta, también se debe a la expresión de los genes (López-Bucio *et al.*, 2003; Seijo *et al.*, 2010). A tal razón y para elaborar nuevos conocimientos científicos, es mejor utilizar organismos modelos de estudio; se les conoce como organismo modelo porque gracias a ellos se conoce mucho mejor el funcionamiento de algunos seres vivos y tienen gran importancia en el laboratorio, los cuales son: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Mus musculus* y *Arabidopsis thaliana* (CSIC, 2017).

#### **2.5.6.4. *Arabidopsis thaliana*: planta modelo de estudio para cultivo *in vitro***

En el orden de las ideas anteriores y por el origen del trabajo, referente a organismos vegetales, la planta de *Arabidopsis thaliana* ha sido empleada como

un organismo modelo para el estudio de la biología molecular, la fisiología y la genética de plantas, aunque no posee un valor agronómico, presenta ciertas ventajas de gran importancia para la investigación básica, tales como: 1) el tamaño pequeño del genoma (5 cromosomas; 125 Mb), 2) un ciclo de vida rápido (aproximadamente 6 semanas desde la germinación hasta la aparición de semillas maduras), 3) fácil producción de semillas, 4) rápido cultivo en condiciones de laboratorio (*in vitro*) y 5) un gran número de líneas transgénicas y mutantes. Además de las ventajas naturales de la planta, su investigación genómica funcional se ha visto impulsada por la disponibilidad de la secuencia completa del genoma, el cual ha permitido a la comunidad científica desarrollar multitud de técnicas moleculares y procedimientos como la introducción de ADN a través de transformación de plantas, métodos eficientes para la realización de cruces, amplias colecciones de mutantes con fenotipos diferentes, gran variedad de mapas de los cromosomas de los genes mutantes y marcadores moleculares, entre otras características (Cuesta-Moliner y Cires-Rodríguez, 2012).

Las condiciones de crecimiento de *A. thaliana* en condiciones *in vitro* se tienen bien estudiadas, sabiendo pues el efecto en la deficiencia de cada uno de los nutrientes (nitrato, fosfato, sulfato y hierro), actúan como señales que pueden ser percibidas, activando mecanismos moleculares que modifican la división celular y los procesos de diferenciación dentro de la raíz y tienen un impacto en la arquitectura del sistema radicular (López-Bucio *et al.*, 2003; Cuesta-Moliner y Cires-Rodríguez, 2012). Por lo que se debe considerar la importancia de que el P es un recurso no renovable, su uso excesivo, las consecuencias ambientales y

que este nutriente altera los procesos de desarrollo de la raíz (López-Bucio *et al.*, 2002; López-Bucio *et al.*, 2003; López-Bucio *et al.*, 2005; López-Bucio *et al.*, 2007; Caffaro *et al.*, 2012). Por tal motivo, el uso de la nanociencia y microciencia en la agricultura, sería un buen sistema de caso de estudio (Carrillo-González y González-Chavez; 2009), utilizando PBDs (Foldori e Invernizzi, 2008).

### **III. JUSTIFICACIÓN**

El uso de plantas modelo como *A. thaliana* en condiciones *in vitro*, es un biosistema que permite mantener controladas las condiciones nutricionales y ambientales; por lo que, algún cambio en estas condiciones indicarán efectos toxicológicos sobre la planta. Por lo anterior, se pretende evaluar si el  $\gamma$ -PGAp pudiera actuar como un material acarreador del fertilizante P y afectar en el crecimiento radicular de *A. thaliana*, constituyendo un estudio sobre los posibles efectos del fertilizante encapsulado en un sistema biológico. Esto con la finalidad de contribuir a la reducción de la aplicación de fertilizante P, el cual podría resultar una buena alternativa para los cultivos agrícolas.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La aplicación del fertilizante P nano/micro-encapsulado con  $\gamma$ -PGAp favorecerá el crecimiento radicular de *A. thaliana* en condiciones *in vitro*.

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo General**

Evaluar el efecto del fertilizante P nano/micro-encapsulado con  $\gamma$ -PGAp en el crecimiento radicular de *A. thaliana* bajo condiciones *in vitro*.

### **5.2. Objetivos Específicos**

- Sintetizar y obtener el  $\gamma$ -PGAp a partir de la bacteria *Bacillus licheniformis* para sintetizar NPs y  $\mu$ Ps encapsulantes de P.
- Evaluar el efecto de  $\gamma$ -PGAp y NPs- $\gamma$ -PGAp con P (NPs c/P) y sin P (NPs s/P) sobre la germinación de semillas de *A. thaliana in vitro*.
- Evaluar el efecto del  $\gamma$ -PGAp, NPs c/s P y  $\mu$ Ps- $\gamma$ -PGA+P ( $\mu$ Ps c/P) en las respuestas a nivel radicular en plantas de *A. thaliana* bajo condiciones *in vitro*.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Material vegetal**

En este trabajo se emplearon semillas para la obtención de plantas de *A. thaliana* tipo silvestre (Col-0), de la cual se sabe las condiciones óptimas y deficientes de los macro y micronutrientes (entre ellas las del P) en las que crece en laboratorio.

### **6.2. Fertilizante inorgánico**

Existe una gamma variada de fertilizantes que contienen P en su molécula, pero el fertilizante que se ocupó para este experimento fue el fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; no. CAS: 7778-77-0), el cual contiene 52% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  (P disponible) y 22% de P (P soluble).

### **6.3. Polímero biológico**

El  $\gamma$ -PGAp, fue extraído de la bacteria *B. licheniformis*. Para su obtención se siguió el protocolo propuesto por Rodríguez-Félix (2006), preparando un caldo nutritivo para inocular la bacteria, el cual se dejó crecer en una incubadora con agitación (New Brunsh, modelo G25 LOND, ING) a 37°C y 250 rpm en un tiempo de 72 h, pasando el tiempo se centrifugó y al sobrenadante se le agregó acetona, para separar el polímero en forma sal el cual fue diluido y purificado en membranas de diálisis, terminado dicha acción fue congelado y liofilizado (Liofilizador Labconco, Modelo 7). Esta parte del trabajo se desarrolló en el laboratorio de Microbiología del departamento de Materiales Avanzados bajo la asesoría del Dr. Jorge Romero-García.

### **6.4. Métodos de encapsulamiento**

La encapsulación del fertilizante P, se llevó a cabo usando el polímero  $\gamma$ -PGAp y se llevaron a cabo dos técnicas de preparación: 1) pre-gelificación ionotrópica propuesto por Sarmiento *et al.* (2006), modificado por Pereira *et al.* (2016) para la obtención de las NPs con y sin P (NPs c/s P) y 2) SPRAY-DRY utilizado para la obtención de  $\mu$ Ps c/P, que fue proporcionado por el Dr. Carlos Espinoza-González del departamento de Materiales Avanzados. Ambos protocolos se describen en el Anexo I.

### **6.5. Estandarización del medio de cultivo Murashige & Skoog**

El medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) propuesto por López-Bucio *et al.* (2002), fue el que se utilizó para hacer crecer *A. thaliana in vitro* y realizar los ensayos (Ver anexo II).

Estos ensayos involucraban la adición de un polímero orgánico y este componente extra en el medio, era una incógnita sobre su comportamiento, por tal motivo para estudiar el posible efecto, se monitoreó las condiciones del medio (pH y solidez) en las diferentes fases del MS, es decir, inmediatamente después de ajustar el pH (5.7 y 8), inmediatamente después de esterilizar y al solidificar el MS, agregándose 1 mg de  $\gamma$ -PGAp por 1 mL de agua destilada en proporciones de 1:1, 2:1 y 1:2.

## **6.6. Análisis realizados con *Arabidopsis thaliana***

### **6.6.1. Desinfección de las semillas**

Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 70% durante 5 min, luego lavadas con hipoclorito de sodio al 20% durante 7 min y por último se enjuagó tres veces con agua estéril.

### **6.6.2. Siembra de las semillas de *Arabidopsis thaliana***

Las semillas se sembraron con ayuda de una micropipeta en cajas Petri con medio MS y ya selladas, fueron colocadas de forma inclinada (75° azimutales), sometidas a frío (4°C) durante 48 h en oscuridad total. Pasado el

tiempo, fueron colocadas en una cámara de crecimiento para plantas (Lumistell ICP-09) con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, 60 % de humedad relativa, a una temperatura de 22°C.

### 6.6.3. Evaluación del porcentaje de germinación

Se evaluó el porcentaje de germinación (% germ) de las semillas de *A. thaliana in vitro* a las 12, 24, 36 y 48 h, en donde se sembraron 10 semillas por caja Petri o 20 por tratamiento. El porcentaje de germinación se calculó con la Fórmula 1.

$$\% germ = \frac{\sum n}{N} * 100$$

Donde:

n= número de las semillas germinadas

N= el número total de semillas germinadas

Las unidades están dadas en (%)

### 6.6.4. Evaluación de la longitud radicular

La evaluación radicular se llevó a cabo a los 1, 8, 15, 22, 29, 36 y 43 días después de la germinación (d.d.g.), midiendo la raíz principal desde la base del tallo, hasta la punta de la raíz con un vernier digital. Las mediciones se realizaron sobre la caja Petri sellada para no provocar contaminación. Una vez teniendo los datos se hizo el cálculo de la velocidad de crecimiento relativo (VCR), para estimar el tamaño de la raíz en relación con el intervalo de tiempo. Dicho dato se obtuvo con la Fórmula 2.

$$VCR = \frac{(M2 - M1)}{(T2 - T1)}$$

Donde:

M1= medición inicial

M2= medición final

T1= día inicial

T2= día final

Las unidades están dadas en cm/d

## **6.7. Diseño experimental**

Se establecieron pruebas multivariadas post hoc, utilizado para probar diferencias en el crecimiento de la raíz primaria (variable de respuesta) de la *A. thaliana*. Se utilizan letras diferentes para indicar los medios que difieren significativamente. Los datos fueron analizados con el software Infostat v2015e (BA, ARG), con un ANVA de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## **VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El propósito de este trabajo fue evaluar el comportamiento en el crecimiento radicular, empleando plantas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre (col-0) como modelo de estudio, utilizando los tratamientos con  $\gamma$ -PGAp, NPS c/s P y  $\mu$ Ps c/P.

### **7.1. Obtención del polímero orgánico**

Del  $\gamma$ -PGAp se obtuvieron 14.56 g/L de caldo nutritivo, superando al rendimiento teórico de 13 g de  $\gamma$ -PGAp/L de caldo nutritivo (Rodríguez Félix,

2006); se obtuvo un total de 20 g de  $\gamma$ -PGAp con un pH 3.4, del cual se tomaron 4 g para realizar algunos ensayos y el resto (16 g) se utilizó para preparar las NPs y  $\mu$ Ps.

## **7.2. Obtención de los encapsulantes**

Con el método de pre-gelificación ionotrópica (la cual fue una técnica de bajo rendimiento productivo), se obtuvieron 482 mg de NPs s/P con un diámetro de 138 nm y 527 mg de NPs c/P con un diámetro de 143.5 nm y, por el método de SPRAY-DRY, se obtuvieron 40 g de  $\mu$ Ps c/P con un diámetro de 20  $\mu$ m, del cual se utilizaron 10 g para llevar a cabo esta investigación.

## **7.3. Estandarización del medio de cultivo**

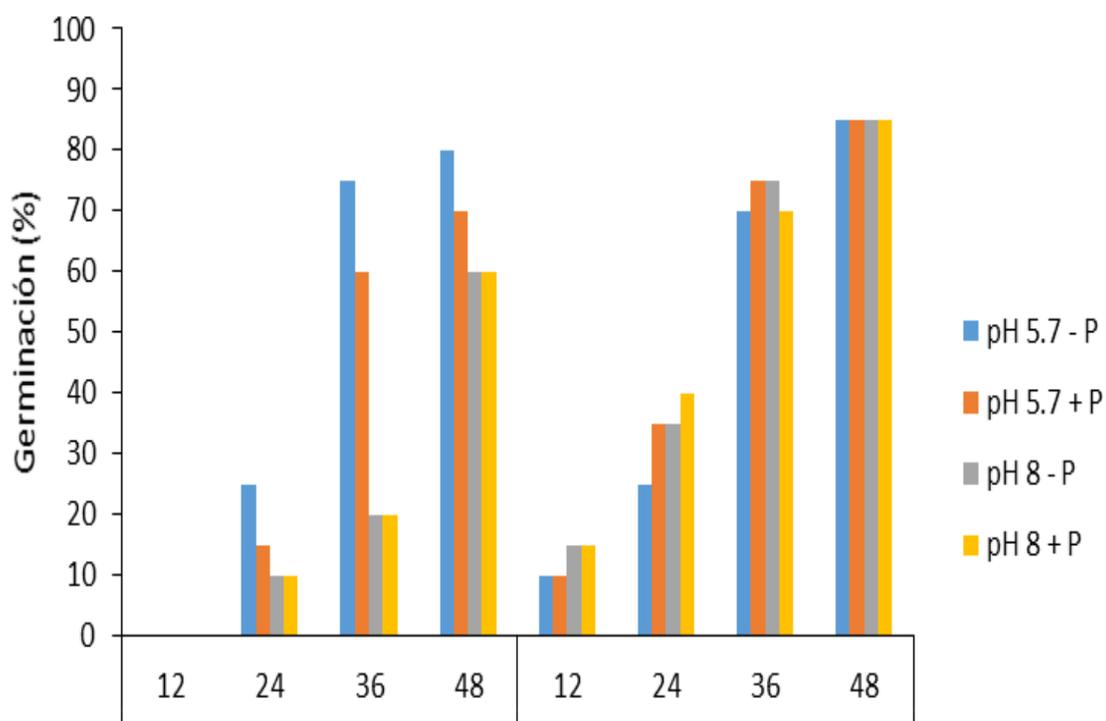
Unas de las variantes del cultivo *in vitro* es la adición de compuestos extras al medio de cultivo MS, ya que el adicionar un compuesto orgánico ( $\gamma$ -PGAp) al medio MS; el pH y la consistencia, variarían en las fases del MS (Anexo VI).

Por lo tanto, las condiciones estándares que deben de presentar el medio de cultivo MS es un pH de 5.7 y es conveniente utilizar un amortiguador de pH (MES), para que este permanezca y el medio cumpla su objetivo que es, solidificar. En este sentido Tjalling-Holwerda (2006), señala que se debe mantener un pH de entre 5 y 6, dado que un pH así mejorará la disponibilidad de los nutrientes como: Fe, Zn, Cu, Mn, B y P.

## **7.4. Efecto del poli (ácido- $\gamma$ - glutámico) sobre la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana***

Para evaluar si el  $\gamma$ -PGAp tiene un efecto en el proceso biológico de germinación, se sembraron semillas de *A. thaliana* en medio MS en dos condiciones de disponibilidad de P, 1) deficiencia de P (0.01 mM de P) y 2) en condiciones óptimas de P (1 mM de P). En ambos casos el pH del medio MS fue ajustado a pH 5.7 y 8 (antes de adicionar el  $\gamma$ -PGAp), dichos medios fueron suplementados con y sin 1 mg de  $\gamma$ -PGAp/1 mL de agua destilada (proporción 1:1).

El pH final en el medio de cultivo MS después de haber agregado el polímero se desconoce; no obstante, los resultados muestran que el  $\gamma$ -PGAp tiene un efecto inductor en la germinación de la semilla de *A. thaliana* a partir de las 12 h después de la siembra en ambos medios donde el pH fue ajustado (5.7 y 8) y, se observa un aumento de un 10% en la germinación en comparación con las semillas que fueron sembradas en el MS con pH ajustado (5.7 y 8) y donde no se agregó el polímero (Figura 3).



**Figura 3. Efecto dosis respuesta del  $\gamma$ -PGAp en la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*.** Semillas de *A. thaliana* fueron sembradas en medio MS a pH 5.7 y 8, suplementadas con  $\gamma$ -PGAp y sin polímero en la proporción 1:1 (1 mg de  $\gamma$ -PGAp/1 mL de agua destilada). Los datos muestran el porcentaje de germinación de 20 semillas por tratamiento.

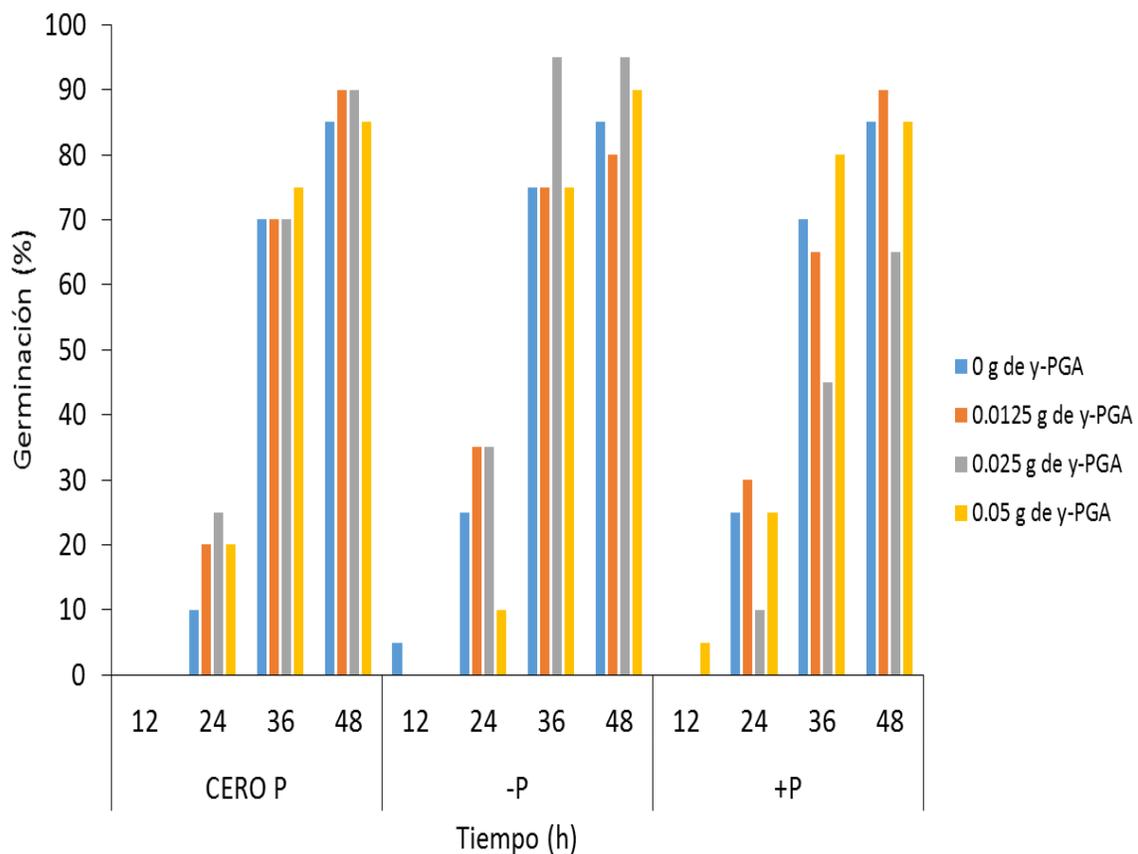
En la Figura 3, se muestra el porcentaje en la germinación de la semilla de *A. thaliana* por efecto de diferentes condiciones de P (0.01 mM; -P y 1 mM; +P), diferentes pH (5.7 y 8) y el  $\gamma$ -PGAp a 12, 24, 38 y 48 h.

Se evaluó el porcentaje de la germinación de las semillas de *A. thaliana* a las 48 h, dado que son reportes que López-Bucio *et al.* (2002) y Shu *et al.* (2016), determinan como el tiempo necesario para que el 100% de las semillas de *A. thaliana* germinen en este sistema (cultivo *in vitro*); en esta investigación no se alcanzó a ver el 100% en la germinación, pero se obtuvo un número considerable de semillas germinadas (hasta un 90% de germinación).

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, en el apartado 7.3; donde se observa que el  $\gamma$ -PGAp influye en el pH y consistencia del medio MS y la Figura 3, donde no se ve clara la respuesta que tuvo el pH, el polímero e inclusive la disponibilidad de P en el porcentaje de la germinación de la semilla. Se realizó en la práctica la siguiente estrategia: se agregó el MES (3.5 mM/L de MS) durante la preparación del MS, se autoclaveó y posteriormente se le agregó el polímero; todo esto, para analizar el porcentaje de la germinación de la semilla de *A.*

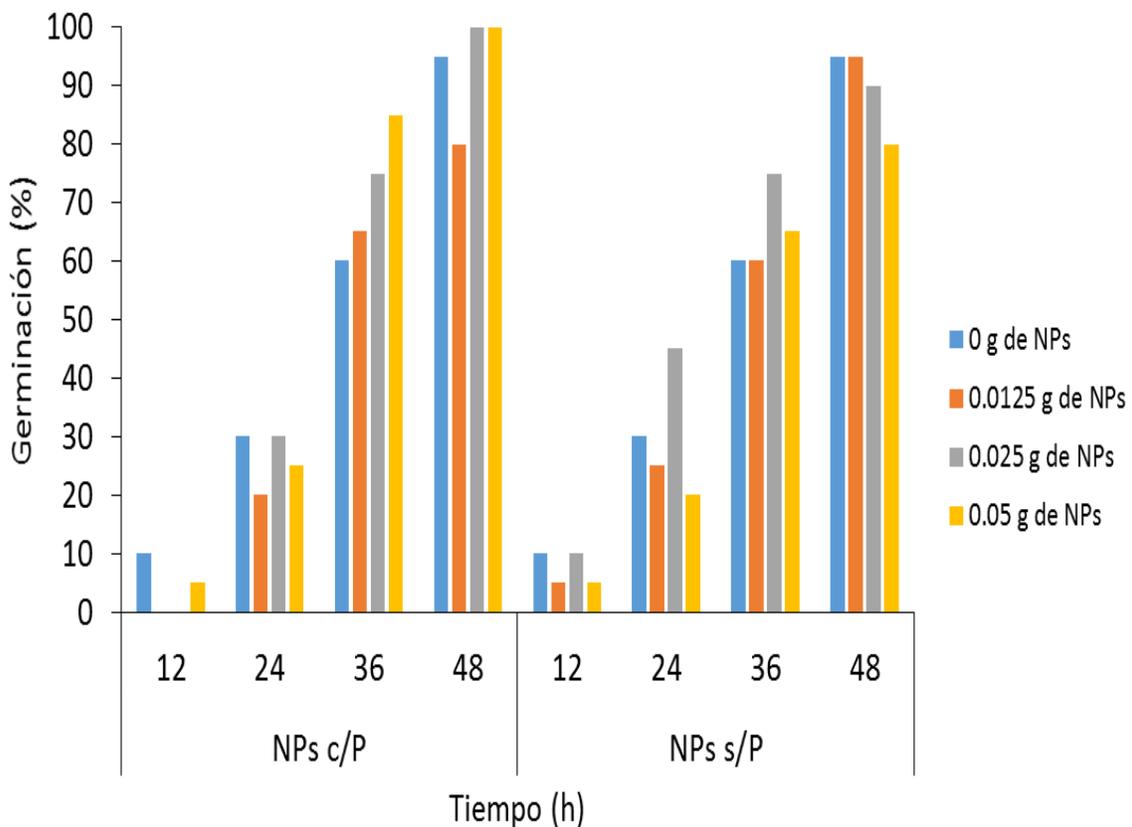
*thaliana*, las cuales fueron sembradas en medio MS en condiciones de P: nulas (s/P o CERO P), deficiente (0.01 mM de P o -P) y óptimas (1 mM de P o +P), así pues, se evaluaron diferentes dosis del  $\gamma$ -PGAp 0, 0.0125, 0.025 y 0.05 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS (Figura 4).

En la Figura 4, se observa el porcentaje de la germinación de la semilla de *A. thaliana in vitro* a las 12, 24, 36 y 48 h, por efecto de condiciones de disponibilidad de P: nulas (CERO P), deficiente (0.01 mM; -P) y óptimas (1 mM; +P), ajustando el MS a un pH de 5.7. Así pues, se puede observar que a las 12 h, se encontró un 5% en el porcentaje de la germinación de la semilla de *A. thaliana* en las condiciones óptimas y deficientes de P, con la dosis de 0 y 0.05 g/L de  $\gamma$ -PGAp; sin embargo en los demás tiempos (24, 36 y 48 h), no existe una tendencia clara en el aumento de la germinación de las semillas tratadas con o sin  $\gamma$ -PGAp y con la disponibilidad de P (Figura 4).



**Figura 4. Efecto dosis respuesta del  $\gamma$ -PGAp en la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*.** Semillas de *A. thaliana* fueron sembradas en medios MS a pH 5.7 y suplementadas con  $\gamma$ -PGAp (0, 0.0125, 0.025, 0.05 g de  $\gamma$ -PGAp/L de medio MS). Los datos muestran el porcentaje en la germinación de 20 semillas por tratamiento.

Como se había mencionado con anterioridad el  $\gamma$ -PGAp y las NPs fueron un factor limitante (dado a las técnica de síntesis, lo que dificultó diseñar ensayos en invernadero con plantas en sustrato), para realizar más ensayos así pues, por último se realizó un ensayo para observar el efecto en la germinación de la semilla de *A. thaliana* en un medio de cultivo MS con las condiciones deficientes de P (0.01 mM; -P) y, pH ajustado a 5.7. Agregando 0, 0.0125, 0.025 y 0.05 g de NPs c/s P/L de MS (Figura 5).



**Figura 5. Efecto dosis respuesta de NPs con y sin P en la germinación de la semilla de *Arabidopsis thaliana*.** Semillas de *A. thaliana* fueron sembradas en medio MS a pH 5.7, con la concentración de 0.01 mM de P, adicionado con 0, 0.0125, 0.025 y 0.05 g de NPs c/s P/L. Los datos muestran el porcentaje de germinación de 20 semillas de *A. thaliana* por tratamiento.

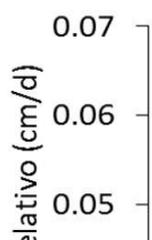
En la Figura 5, se observa el porcentaje de la germinación de la semilla de *A. thaliana in vitro* a las 12, 24, 36 y 48 h, en condiciones deficientes P (0.01 mM de P; -P) y suplementados con NPs c/s P en las dosis 0, 0.0125, 0.025 y 0.05 g de NPs/L de MS. Se puede observar que las semillas de *A. thaliana* tratadas con NPs c/P presentan una tasa de germinación menor (5%) a las 12 h, con respecto a las semillas donde no se suplementaron las NPs c/P; en el caso del medio MS al cual se suplementaron las NPs s/P, comenzó el proceso de germinación a las 12 h en todos los casos, donde la dosis de 0.025 g de NPs s/P/L de MS se asemejó a las semillas que no fueron tratadas con las NPs. Posteriormente a las 24 h las semillas de *A. thaliana* sometidas a la dosis de 0.025 g de NPs c/P igualó a las semillas que no fueron tratadas con las NPs, superando a las otras 2 dosis; de igual manera, las semillas de *A. thaliana* tratadas con NPs s/P, superó con un 10% a las semillas que no fueron tratadas con NPs y así, superó a las otras dos dosis, pero no se observó esa misma tendencia a las 36 y 48 h. No obstante Pereira *et al.* (2016), señalan, que en semillas de *Phaseolus vulgaris*, al ser añadidas las NPs de  $\gamma$ -PGAp/CS+GA<sub>3</sub>, se alcanza una alta actividad biológica, aumentando la tasa de germinación en el primer día (50-70%), en comparación con GA<sub>3</sub> libre (10-16%). Estos no son similares al trabajo, pero es una idea que las NPs de  $\gamma$ -PGAp,

pueden ser utilizadas en otros tipos de cultivos e inclusive dar resultados favorables. De estos datos cabe considerar que las semillas tienen su propio potencial y vigor para iniciar la germinación (Luan *et al.*, 2006; Laynez-Garsaball *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2012), por lo cual, no se cumple con un patrón homogéneo en todos los resultados obtenidos.

Un punto a discusión, pudiera ser que tanto el  $\gamma$ -PGAp y las NPs *per se* a la acidez vencen la latencia de las semillas, así pues Bilbao-Larrigan (2010) y Varela y Aparicio (2011), mencionan que uno de los tratamientos que utilizan para vencer la latencia o letargo en semillas, es la técnica de inmersión en medio ácido (ácido sulfúrico), donde este actúa provocando un estrés que inhibe la dormancia.

### **7.5. Velocidad del crecimiento relativo de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana***

Dentro de este orden de ideas que anteceden, se tomó la velocidad del crecimiento relativo de la raíz primaria de la *A. thaliana*, primeramente en el medio de cultivo donde fue ajustado el pH (5.7 y 8) y se añadió el polímero en proporción 1:1 (1 mg de  $\gamma$ -PGAp/1 mL de agua destilada) y con las concentraciones 0.01 mM y 1 mM de P, tomando sus respectivos controles (Figura 6). Aunado a lo anterior, esta medición se realizó a los 5 d.d.g., dado que se presentaron problemas de contaminación en las muestras donde se encontraba presente el polímero.

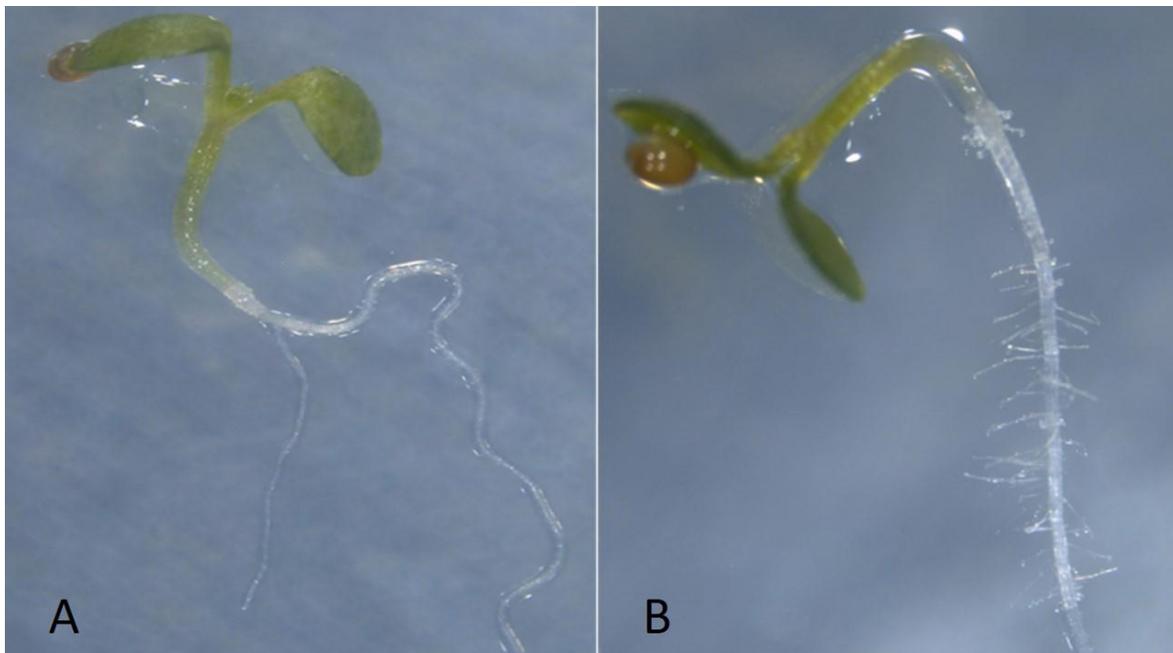


**Figura 6. Efecto del  $\gamma$ -PGAp sobre la velocidad del crecimiento de la raíz primaria de plantas de *Arabidopsis thaliana*.** Plantas de *A. thaliana* fueron crecidas en medio MS ajustados a pH 5.7 y 8, en condiciones de deficiencia de P (0.1 mM) y óptimas de P (1 mM), suplementadas con la proporción 1:1 (1 mg de  $\gamma$ -PGAp/1 mL de agua destilada) y sin el polímero. Los datos muestran los promedios de la tasa de crecimiento de la raíz primaria en cm/d. n= 20 plantas. Las letras diferentes muestran la diferencia estadística a partir del análisis Tukey  $p < 0.05$ .

En la Figura 6, se puede observar que  $\gamma$ -PGAp tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de la raíz primaria sin importar la condición de crecimiento tanto de pH o concentración de P. Estos efectos fueron aún más claros en las plantas crecidas a pH ácido (5.7) y condición óptima de P (1 mM), observándose una inhibición en la velocidad de crecimiento de hasta 9 veces comparadas con sus plantas control (sin el  $\gamma$ -PGAp). Sin embargo, en la condición de pH 8 y óptimo de P, se pudo observar una menor inhibición en la velocidad de crecimiento de la raíz primaria en comparación con las plantas control, siendo esta de alrededor del 40% (Figura 7). Estudios previos han mostrado que en condiciones de 1 mM de P y pH

5.7, la raíz de la planta, muestra un óptimo crecimiento (López-Bucio *et al.*, 2002; Figura 6).

Lo anterior podría suponer que el  $\gamma$ -PGAp al ser de origen bacteriano, podría estar induciendo alguna respuesta al estrés en *A. thaliana* como posible elicitor, dado que las infecciones bacterianas pueden afectar el desarrollo de las plantas, como lo indica Arana-Labrada (2006), quien aplicando elicitores bióticos observó que se encontró disminución en la altura de las plantas de *Digitalis purpurea* en los tratamientos con elicitores con respecto al control sin elicitores.

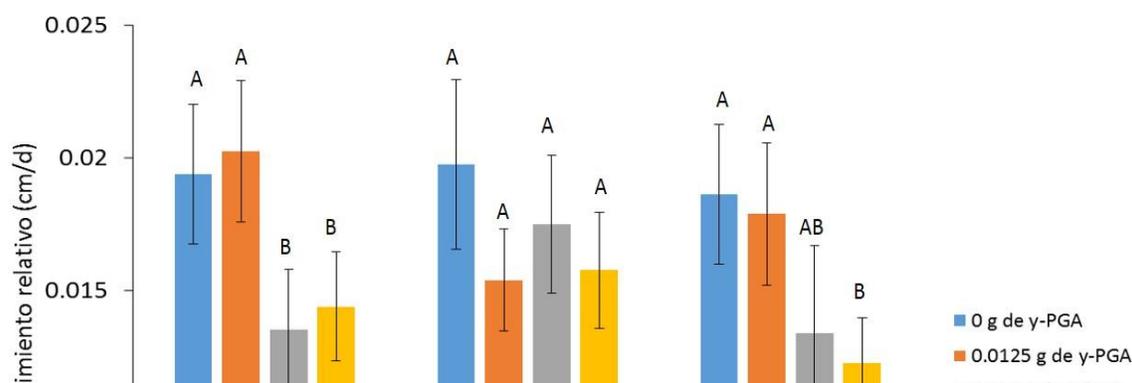


**Figura 7. Efecto de la respuesta del P en el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana* crecidas en medio MS. A) Arquitectura radicular de *A. thaliana* crecida en un medio MS con condiciones óptimas de P y B) Arquitectura radicular de *A. thaliana* crecida en un medio MS con condiciones deficientes de P.**

En la Figura 7, se muestra el crecimiento de la arquitectura de la raíz de *A. thaliana* crecidas en condiciones óptimas (1 mM de P; Figura 7A) y en condiciones de deficiencia de P (0.01 mM de P; Figura 7B). Se puede observar que en la condición de deficiencia de P una inducción en la formación de pelos radiculares; existe un mayor número y longitud de estos no mostrados en comparación con las plantas crecidas en condiciones óptimas de P (Figura 7).

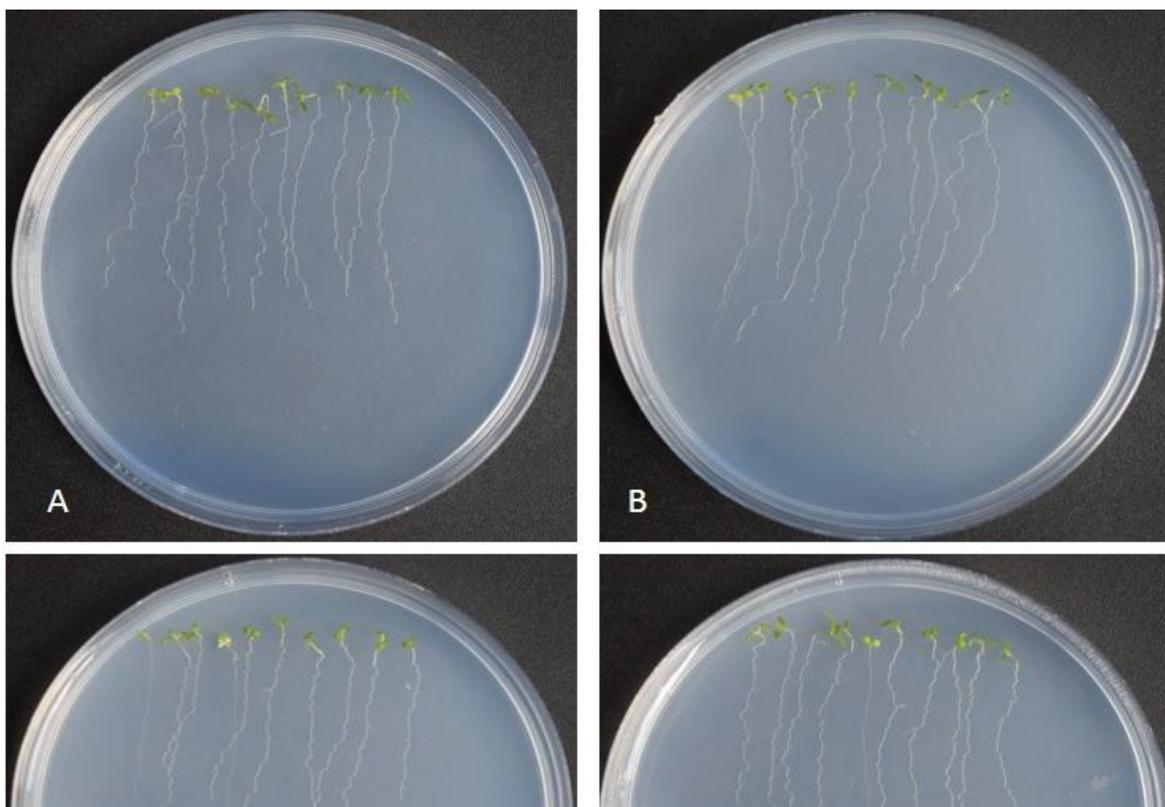
En este propósito y siguiendo con las mediciones de la velocidad de crecimiento de la raíz primaria de la planta de *A. thaliana* es evidente entonces, que el siguiente ensayo, sólo se planteó ajustando el MS a pH 5.7, el cual también fue modificando en las condiciones de P, 0.01 mM y 1 mM de P y la dosis de 0, 0.0125, 0.025 y 0.05 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS (Figura 7).

Así pues, las plantas que fueron germinadas y crecidas en dichas condiciones, se pudo observar que el  $\gamma$ -PGAp muestra un efecto dosis dependiente en la concentración siendo este más claro en la condición de deficiencia de P (Figura 8), en las plantas crecidas en condiciones óptimas de P, se puede observar que hay una ligera recuperación en la inhibición de la velocidad de crecimiento en las plantas cuando son crecidas en las diferentes concentraciones de  $\gamma$ -PGAp (Figura 8). Pero aún más notorio se puede observar el efecto en la condición nula de P (CERO P; Figura 8).



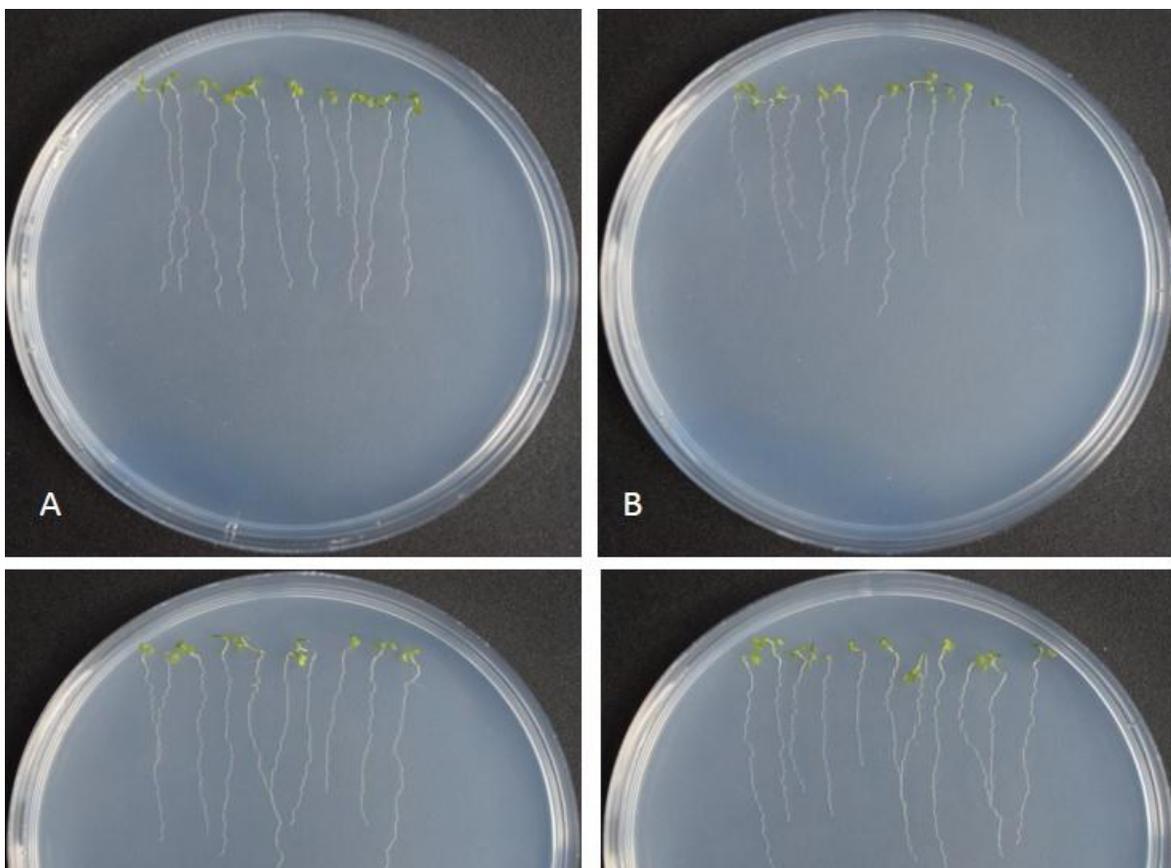
**Figura 8. Efecto dosis respuesta del  $\gamma$ -PGAp en la velocidad de crecimiento relativo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.** Plántula de *A. thaliana* fueron crecidas en medio MS en condiciones nulas, deficientes y óptimas de P; las cuales fueron suplementadas con diferentes concentraciones de  $\gamma$ -PGAp (0, 0.0125, 0.025, 0.05 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS) los datos muestran los promedios de la tasa de crecimiento de la raíz primaria en cm/d. n= 20 plantas por tratamiento. Las letras diferentes muestran la diferencia estadística a partir del análisis Tukey  $p < 0.05$ .

A continuación se muestran fotografías representativas del crecimiento de las plantas *A. thaliana* en las cuales se pueden observar las respuestas del crecimiento radicular en respuesta al  $\gamma$ -PGAp obtenida de este ensayo (Figura 9-11).



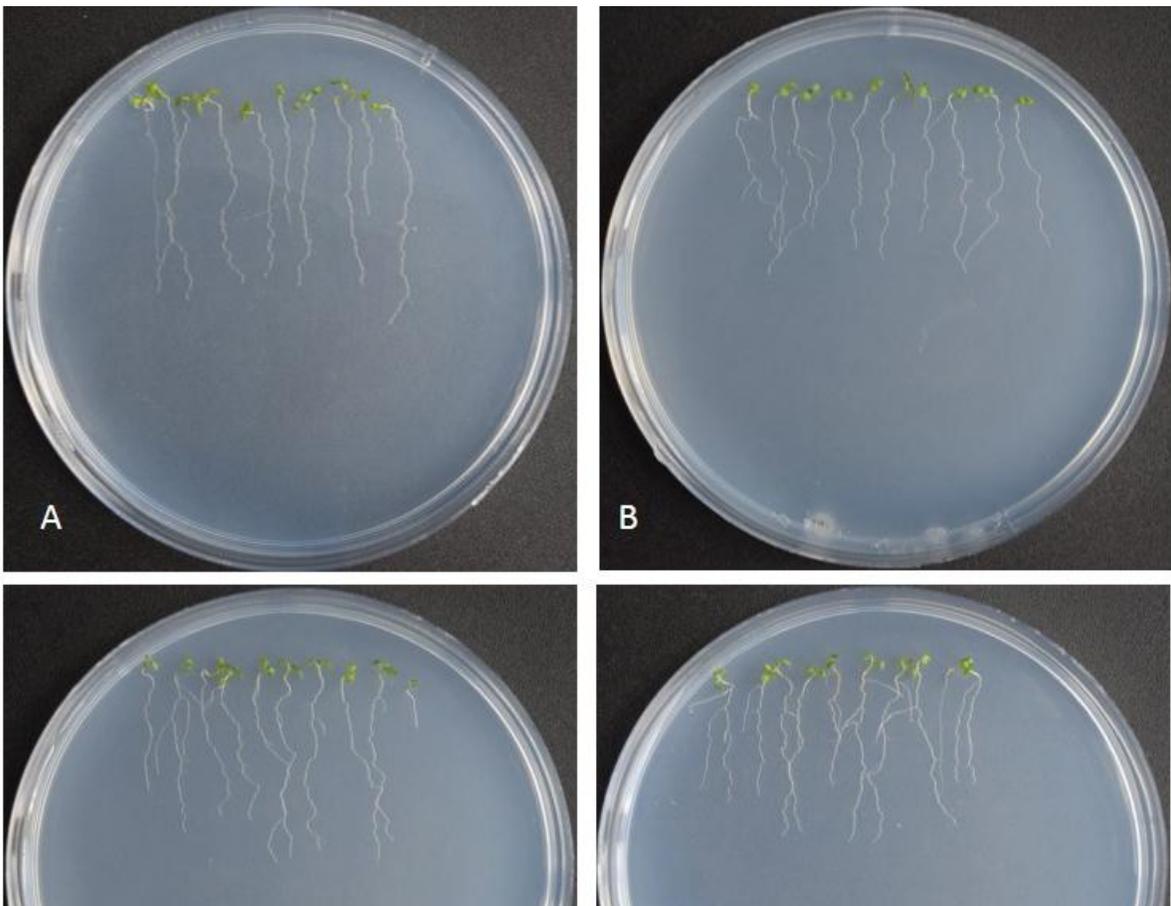
**Figura 9. Efecto de la respuesta del  $\gamma$ -PGAp en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.** Fotos representativas del crecimiento de *A. thaliana* en el medio de cultivo MS con dosis óptima (1 mM de P), pH ajustado a 5.7, añadiendo en el medio  $\gamma$ -PGAp A) tratamiento control (1 mM de P; sin  $\gamma$ -PGAp), B) 1 mM de P; 0.05 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS, C) 1 mM de P; 0.025 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS y D) 1 mM de P; 0.0125 g de  $\gamma$ -PGAp/ L de MS.

En la Figura 9, se puede observar el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* creciendo en un medio rico en todos sus nutrientes y como se muestra en la Figura 9A tal y como lo indica López-Bucio *et al.* (2002) y Caffaro *et al.* (2012), existe crecimiento de raíz lateral; sin embargo en la Figura 9B con 0.05 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS no se observa dicho comportamiento, pero estos patrones se



**Figura 10. Efecto de la respuesta del  $\gamma$ -PGAp en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.** Fotos representativas del crecimiento de la planta de *A. thaliana* en el medio de cultivo MS con dosis deficiente de P (0.01 mM de P), pH ajustado a 5.7, añadiendo en el medio  $\gamma$ -PGAp A) tratamiento control (0.01 mM de P; sin  $\gamma$ -PGAp), B) 0.01mM de P; 0.05 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS, C) 0.01 mM de P; 0.025 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS y D) 0.01 mM de P; 0.0125 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS.

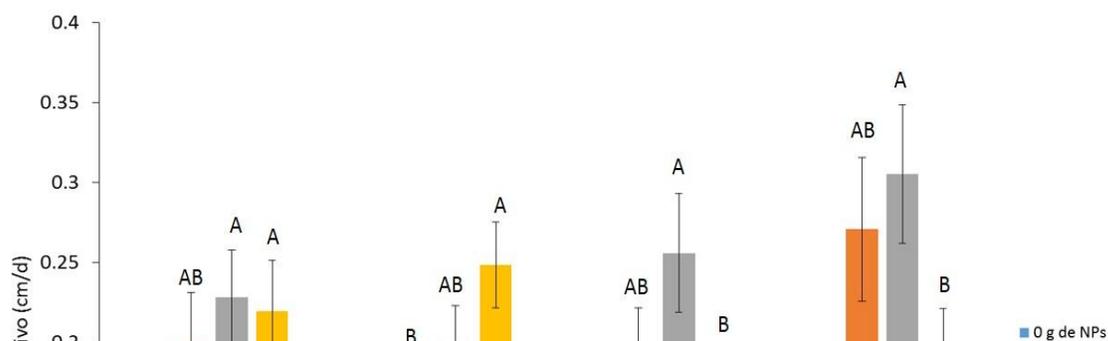
En la Figura 10, se observa el crecimiento y desarrollo *A. thaliana* creciendo en un medio deficiente de P (0.01 mM), en este caso no presenta pelos radiculares, como lo señala López-Bucio *et al.* (2002) y Caffaro *et al.* (2012).



**Figura 11. Efecto de la respuesta del  $\gamma$ -PGAp en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.** Fotos representativas del crecimiento de la planta de *A. thaliana* en el medio de cultivo MS sin P (nulo; 0 mM de P), pH ajustado a 5.7, añadiendo en el medio  $\gamma$ -PGAp A) tratamiento control (0 mM de P; sin  $\gamma$ -PGAp), B) 0mM de P; 0.05 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS, C) 0 mM de P; 0.025 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS y D) 0 mM de P; 0.0125 g de  $\gamma$ -PGAp/L de MS.

En la Figura 11, se puede observar el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* creciendo en un medio carente de P (0 mM de P) y con la matriz polimérica  $\gamma$ -PGAp en la cual se nota en la Figura 11A, el control absoluto, es decir, sin P y sin  $\gamma$ -PGAp, la cual muestra raíces glabras; pero esto no se presentó en las Figura 11B, C y D, ya que, en estas se muestra el crecimiento de pelos radiculares, siendo más evidente en la Figura 11D.

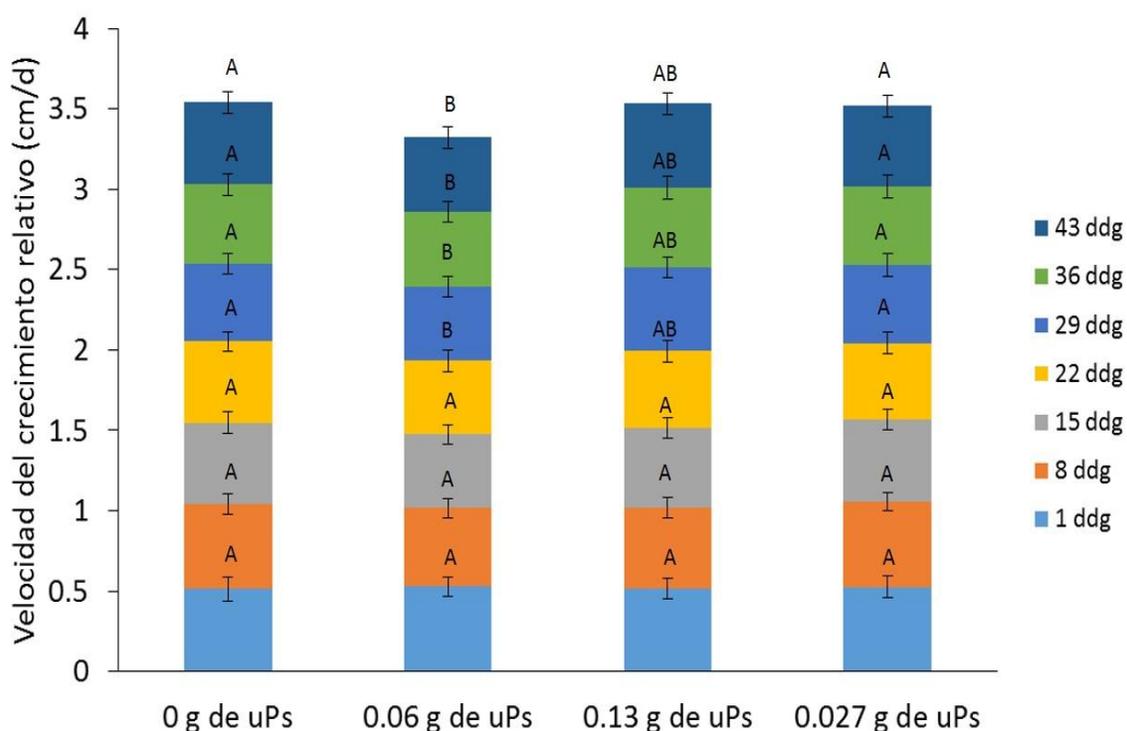
Por otra parte se realizaron los estudios con NPs c/s P, para observar el efecto en la velocidad de crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana* en un medio de cultivo MS deficiente de P; esto para verificar si las NPs c/P estaban liberando su contenido y/o si las NPs s/P, tienen algún efecto en este desarrollo de las raíces, por las consideraciones que se han visto sobre el  $\gamma$ -PGAp. Las dosis en las que se usaron ambas NPs (c/s P), fueron 0, 0.0125, 0.025 y 0.05 g de  $\gamma$ -PGAp/L de medio MS (Figura 12).



**Figura 12. Efecto de las NPs sobre la velocidad de crecimiento relativo de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*.** Plantas de *A. thaliana* fueron germinadas y crecidas en medios MS en diferentes condiciones de deficiencia de P. Los datos muestran los promedios de la tasa de crecimiento de la raíz primaria en cm/d. n= 20 plantas por tratamiento. Las letras diferentes muestran la diferencia estadística a partir del análisis Tukey  $p < 0.05$ .

Los datos muestran que el efecto de las NPs aún sin tener encapsulado el P (sólo la matriz), tiene un efecto promotor en la velocidad de crecimiento relativo de la raíz primaria. Estos efectos los podemos observar como las plantas a 1 d.d.g., aun en la condición de deficiencia de P (0.01 mM), muestran un crecimiento dosis dependiente de la concentración de las NPs (matriz; Figura 12), además, se puede observar que este efecto inductor en la velocidad de crecimiento se incrementa en las NPs c/P (Figura 12). Es interesante como se puede apreciar que existe cierta relación de un incremento en la velocidad de crecimiento en la raíz primaria en etapas tempranas (1 d.d.g.), en las NPs c/P en comparación a tiempos tardíos (5 d.d.g.), cuya velocidad de crecimiento se reduce en casi un 20%. Estos resultados sugieren que en fases tempranas se da una pronta liberación de P de las NPs favoreciendo el mayor crecimiento (Figura 12).

Si bien los efectos mostrados por las NPs en la inducción en la velocidad de crecimiento de la raíz primaria dosis dependiente y en etapas tempranas. A manera de valorar una forma diferente de encapsular el P, se evaluó el efecto de un encapsulado de  $\mu$ Ps c/P, se evaluó el efecto dosis dependiente de la concentración de  $\mu$ Ps c/P (0, 0.06, 0.13, 0.27 g de  $\mu$ Ps c/P/L de MS), sobre el crecimiento de la raíz primaria. A diferencia de las NPs, las  $\mu$ Ps c/P no muestran un efecto inductor en la velocidad de crecimiento de la raíz primaria siendo este muy similar en las diferentes concentraciones de  $\mu$ Ps c/P evaluadas (Figura 13).



**Figura 13. Efecto de las  $\mu$ Ps sobre la velocidad de crecimiento relativo de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*.** Plantas de *A. thaliana* fueron germinadas y crecidas en medios MS en condiciones de deficiencia (0.01 mM de P) y ajustado a pH 5.7 suplementadas con  $\mu$ Ps c/P (0, 0.06, 0.13, 0.27 g de  $\mu$ Ps c/P/L de MS). Los promedios de la tasa de crecimiento de la raíz primaria en cm/d. n= 20 plantas por tratamiento. Las letras diferentes muestran la diferencia estadística a partir del análisis Tukey p<0.05.

En la Figura 13, se muestra la velocidad del crecimiento relativo de la raíz primaria de la *A. thaliana*, desde el primer d.d.g. hasta los 43 d.d.g., observando un crecimiento agrupado, esta figura indica la velocidad al pasar los días en el que las plantas van tomando los nutrientes y van aumentando biomasa, asimismo crecen y se desarrollan, hasta llegar a un punto en el que se observa que ya no hay crecimiento vegetal (29 d.d.g.), siguiendo ese mismo orden y por lo tanto ya no aumentan más de biomasa, provocando lo que se observó en todos los tratamientos clorosis por la falta de los nutrientes dentro del medio de cultivo (Figura 14). Pero en sí hubo diferencia significativa en la comparación de medias.

En el experimento, todas las plantas al alcanzar los 25 ddg se empezó a presentar clorosis en todos los tratamientos (Figura 14), esto puede ser debido de una deficiencia de algún nutriente y, este síntoma de deficiencia es característico del N, así lo indica, Meléndez y Molina (2002); aunado a esto, que las plantas deben ser cambiados de medio a las 3 o 4 semanas



**Figura 14. Efecto de las  $\mu$ Ps en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.** Fotografía representativa del crecimiento *in vitro* de plantas de *A. thaliana* en medio MS suplementado con 0, 0.06, 0.13 y 0.27 g de  $\mu$ Ps/L de MS. Se puede observar clorosis generalizada en las plantas.

Así pues Tjalling- Holwerda (2006), menciona que la curva del crecimiento de la planta, debe seguir una tendencia en la cual se observe un crecimiento favorable para la planta, lo que indicaría que la planta se encuentra en un medio con la nutrición balanceada y así los tejidos en cada fase de la planta vaya creciendo hasta llegar a un tope, comentando que en un caso de desequilibrio, ocurrirá la reducción en el comportamiento potencial con respecto por la deficiencia e inclusive por el exceso. De igual manera Sancho (1994), menciona que la curva de absorción es la representación gráfica de la extracción de un nutriente y representa las cantidades de este elemento extraído por la planta durante su ciclo de vida, esta extracción depende de factores internos (potencial genético y edad de la planta), como externos (temperatura, humedad, brillo solar, etc.).

Los estudios de absorción contabilizan de una forma u otra, la extracción o consumo de nutrientes de un cultivo para completar su ciclo de producción. Estos estudios no constituyen una herramienta de diagnóstico como el análisis foliar, sino más bien, contribuyen a dar solidez a los programas de fertilización; los datos de los estudios de absorción de nutrientes, son valiosos cuando se refieren a un rendimiento dato (viabilidad de germinación, rendimiento productivo, etc.), pues las necesidades de nutrientes cambian con el rendimiento; por otro lado, la capacidad de absorción de un cultivo bajo condiciones nutricionales limitantes se reduce y esta es la razón para que los estudios de absorción deban conducirse bajo condiciones nutricionales óptimas (Bertsch, 2005).

A todos estos cambios le atribuimos que el fertilizante se ha liberado lentamente, datos que reportó Hernández-Rodríguez (2017), quien evaluó la liberación *in vitro* del fosfato monopotásico microencapsulado con  $\gamma$ -PGAp bajo condiciones de pH y temperatura, encontró que a pH 5 y una temperatura de 20°C el microencapsulado empieza a liberar su contenido de los 12 a los 22 días.

## VIII. CONCLUSIONES

De las pruebas realizadas en la tasa de germinación de las semillas de *A. thaliana* por el efecto de la matriz polimérica ( $\gamma$ -PGAp) y de las NPs c/s P, no es clara la tendencia entre el comportamiento con uno y otro tratamiento (pH, disponibilidad de P o por efecto *per se* del  $\gamma$ -PGAp y/o NPs), dado que cada semilla tiene un potencial, vigor y una latencia diferente para llevar a cabo este proceso biológico (germinación).

De las pruebas realizadas para evaluar el efecto del  $\gamma$ -PGAp, NPs c/s P en las respuestas a nivel radicular de la *A. thaliana*, son datos que fueron interrumpidos por el crecimiento de microorganismos en las cajas Petri (hongos, bacterias y levaduras); pero lo que se llega a discernir, es que el uso de estas NPs c/s P, en cantidades mínimas, tienen un efecto en el incremento del crecimiento de la raíz primaria.

De las pruebas realizadas para evaluar el efecto de las  $\mu$ Ps c/P, en las respuestas a nivel radicular de *A. thaliana in vitro*, se observó que no existe diferencia significativa entre la interacción de dosis de  $\mu$ Ps c/P y los d.d.g., dado que, existe un crecimiento exponencial y, a partir de los 29 días no presentan cambios en el crecimiento radicular, esto dado que, las plantas deben de ser cambiadas del medio de cultivo MS a las 2 o 3 semanas.

## **IX. PERSPECTIVAS**

Por todo lo anterior dicho y para enriquecer este trabajo, el cual es una pauta para que se sigan las investigaciones, se deben de:

- Realizar nuevas pruebas para verificar los datos obtenidos en los resultados donde las cajas Petri se contaminaron ( $\gamma$ -PGAp y NPs c/s P), para tener datos más precisos.
- Realizar nuevas pruebas con el material nano y microencapsulado probando su efecto en la germinación de semillas de plantas de importancia económica que estén certificadas (tomate, chile, trigo, etc).
- Evaluar pruebas bioquímicas, fisiológicas, morfológicas (en la zona área, como en la zona radical).
- Hacer pruebas en invernadero.

## X. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Akagi, T., T. Kaneko, T. Kida y M. Akashi. 2005. Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles base on poly ( $\gamma$ -glutamic acid) with L-phenylalanine and a protein carrier. *Journal of Control Release* 108(2-3): 226- 236.
- Arana-Labrada, F. 2006. Efecto de elicitores bióticos y abióticos en algunas variables morfológicas y contenido de digoxina y digitoxina en la multiplicación *in vitro* de brotes de *Digitalis purpurea* L. en medio de cultivo semiólido. Tesis de Maestría. Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. Santa Clara, Cuba. 52 pp.
- Bajaj, I. y R. Singhal. 2011. Poly (glutamiac acid) an emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology* 102 (10): 55-61.
- Banco Mundial. 2014. Consumo de fertilizantes (kilogramos por hectárea de tierras cultivables). Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación. Disponible On line: <https://datos.bancomundial.org/indicador/AG.CON.FERT.ZS?view=chart>
- Berros, V. y R. Peiteado. 2015. De la experiencia de los agroquímicos a los incipientes desafíos de los nano-agroquímicos: riesgos manufacturados y

- derecho a un ambiente sano en Argentina. Revista Iberoamericana de Filosofía, Política y humanidades 17 (33): 229-251.
- Bertsch, F. 2005. Estudios de absorción de nutrientes como apoyo a las recomendaciones de fertilización. Informaciones agronómicas 57: 1-10.
- Bilbao-Larrigan, E. 2010. Estudio de tratamientos pregerminativos en semilla de *Fagus sylvatica* L. Tesina de Licenciatura. Escuela Técnica Superior de Ingeniero Agrónomos. Valle de Atxondo, Vizcaya. 67 pp.
- Caffaro, M.M., G. Rubio, J. M. Vivanco. 2012. Exudados radicales y su efecto en la arquitectura radical de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 67pp.
- Carrillo-Freire, D. 2015. Encapsulación de polifenoles para su aplicación como fungicidas. Trabajo de Máster. E.T.S. Campus de la Yutera, Palencia. 27pp.
- Carrllio-González, R. y M. del C. A. González-Chávez. 2009. La nanotecnología en la agricultura y rehabilitación de los suelos contaminados. Mundo nano 2 (2): 50-63.
- Cartelle, G. M. y J. Zurita. 2015. La nanotecnología en la producción y conservación de alimentos. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición 25 (1): 184-207.
- CSIC. 2017. Seres modélicos entre la naturaleza y el laboratorio. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Cataluña, España. Disponible On Line: <http://seresmodelicos.csic.es/>
- Cuesta-Moliner, C. y E. Cires-Rodríguez. 2012. *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo en biología. Boletín de Ciencias Naturales RIDEA 52: 175-178.
- Domínguez- Rosales, M. S., M de la L. González-Jiménez, C. Rosales-Gómez, C. Quiñones-Valles, S. Delgadillo-Díaz de León, S. J. Mireles- Ordaz y E. Pérez Molphe Balch. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. Revista Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (41): 53-62.
- Elizondo- Salazar, R.M J. A. 2007. Fósforo: Importancia, problemas ambientales y requerimientos en ganado de leche. Regional Animal Production Curses. Balsa de Atenas, Costa Rica. 1-7.
- Epstein, E. y J. A. Bloom. 2005. Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. Sinauer Associates. 1. 1-3.

- Esparza-Rivera, E. L. 2015. Actividad antimicrobial de nanopartículas de cobre y óxido de zinc contra hongos y bacterias fitopatógenas. Tesis de Licenciatura. Departamento de Botánica. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 64pp.
- FAO. 2002. Los fertilizantes y su uso. Organización de para la alimentación de la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés: Food and Agriculture Organization). Roma, Italia. 1-87.
- FAO. 2015. Los suelos sanos son la base para la producción de alimentos sustentables. Organización de para la alimentación de la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés: Food and Agriculture Organization). Roma, Italia. 1-4.
- Feizi, H., P.R. Moghaddam, N. Shahtahmassebi y A. Fotovat. 2012. Impact of bulk and nanosized titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) on wheat seed germination and seedling growth. *Biological Trace Element Research* 146: 101-106.
- Foldori, G. y N. Invernizzi. 2008. Nanotecnologías en la alimentación y en la agricultura. Universidad de la República, Comisión Sectorial de Extensión y Actividades en el Medio. Montevideo, Uruguay. 116pp.
- Gaucin, D., E. M. Ramírez, F. J. Hernández-Valtierra y C. G. Cervantes-Rodríguez. 2016. El mercado de los fertilizantes (II). Opinión y Análisis. *El Economista*. 11.
- Gavi-Reyes, F. 2001. Uso de fertilizantes. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural y Pesca. Texcoco, México. 11pp.
- Ghodake, G., Y.D. Seo, D.H. Park y D.S. Lee. 2010. Phytotoxicity of carbon nanotubes assessed by *Brassica juncea* and *Phaseolus mungo*. *Journal Nanoelect Optoelect* 5: 157-160
- Goldberg, M., R. Langer y X. Jia. 2012. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 18 (3): 241-268.
- Grucere, G.P. 2012. Implications of nanotechnology growth in food and agriculture in OECD countries. *Food Policy* (37): 191-198.
- Guevara-Bretón, N.A. y M.T. Jiménez-Munguía. 2008. Temas selectos de ingeniería de alimentos 2 (1): 22-27.
- Gutiérrez-Castorena, E. V., M. C. Gutiérrez-Castorena y C.A. Ortiz-Solorio. 2015. Manejo integrado de nutrientes en sistemas agrícolas intensivos: Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5 (1): 201- 215.

- Gutiérrez-López, G.F. 2009. Microestructura, nanotecnología y nanociencia de alimentos. *Alimento* 1: 1-32.
- Hernández-Frutis, M. 2015. Efecto de la aplicación de nanopartículas de titanio, hierro y zinc, en la micromorfología de raíz y tallo de girasol y frijol en invernadero. Tesis de Licenciatura. Departamento de Botánica. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 91pp.
- Hernández-Rodríguez, M. 2017. Evaluación de la liberación *in vitro* de fosfato monopotásico microencapsulado con poli (ácido- $\gamma$ -glutámico) bajo condiciones de pH y temperatura. Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica de Pachuca. Pachuca de Soto, Hidalgo, México. 60 pp.
- Hong, F., J. Zhou, C. Liu, F. Yang, C. Wu, L. Zheng y P. Yang. 2005. Effect of nano-TiO<sub>2</sub> on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biological Trace Element Research*. 105: 269-279.
- Juhel, G., E. Batisse, Q. Hugues, D. Daly, F.N.A.M. van Pelt, J. O'Halloran y M.A.K. Jansen. 2011. Alumina nanoparticles enhance growth of *Lemna minor*. *Aquat Toxicology* 105: 328-336.
- Khodakovskaya, M., E. Dervishi, M. Mahmood, Y. Xu, Z. Li, F. Watanabe y A.S. Biris. 2009. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano* 3: 3221-3227.
- Kreij, C., W. Voogt, A.L. Van den Bos y R. Baas. 1999. Bemestingsadviesbasis substraten. Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente, Naldwijk, The Netherlands. 1387-2427.
- Larue, C., J. Laurette, N. Herlin-Boime, H. Khodja, B. Fayard, A. Flank, F. Brisset, M. Carriere. 2012. Accumulation, translocation and impact of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum*): influence of diameter and crystal phase. *Science of the Total Environment* 431: 197-208.
- Layne-Garsaball, J. A., J. R. Méndez-Natera y J. Mayz-Figueroa. 2008. Efecto del potencial osmótico y del tamaño de la semilla sobre la germinación y crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) bajo condiciones de laboratorio. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 11 (1): 26-34.

- Lee, C.W., S. Mahendra, K. Zodrow, D. Li, Y.C. Tsai, J. Braam, P.J. Alvarez. 2010. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology Chemistry* 29 (3): 669-675.
- Lei, Z., S. Mingyu, W. Xiao, L. Chao, Q. Chunxiang, C. Liang, H. Hao, L. Xiaoqing y H. Fashui. 2008. Antioxidant stress is promoted by nanoanatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. *Biological Trace Element Research* 121:69-79.
- López-Bucio, J., E. Hernández-Abreu, L. Sánchez-Calderón, M. F. Nieto-Jacobo, J. Simpsons y L. Herrera-Estrella. 2002. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology* 129. 244-256.
- López-Bucio, J., A. Cruz-Ramírez y L. Herrera-Estrella. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6. 280-287.
- López-Bucio, J., E. Hernández-Abreu, L. Sánchez-Calderón, A. Pérez-Torres, R. A. Rampeym B. Bartel y L. Herrera-Estrella. 2005. An auxin transport independent pathway in involved in pahosphate strees- induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiology* 137. 681-691.
- López-Bucio, J., M. Millán-Godínez, A. Méndez-Bravo, A. Morquecho-Contreras, E. Ramírez-Chávez, J. Molina—Torres, A. Pérez-Torres, M. Higuchi, T. Kakimoto y L. Herrera-Estrella. 2007. Cytokinin receptors are involved in alkamide regulation of root and shoot development in *Arabiodopsis*. *Plant Physiology* 145. 1703-1713.
- Luan, V. Q., N. Q. Thien, D. V. Khiem y D. T. Nhut. 2006. *In vitro* germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. *Proceedings of international Wokshop on Biotechnology in Agriculture*. Universidad Estatal de Nong Lam Ho, China. 177 pp.
- Lugo-Medina, E., C. García-Gutiérrez y R. D. Ruelas-Ayala. 2010. Nanotecnología y encapsulación de plaguicidas. *Revista Ra Ximhai* 6 (1): 63-67.
- Lupo-Pasin, B., C. González-Azón y A. Maestro-Garriga. 2012. Microencapsulación con alguinato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 3 (1): 130-151.

- Maldonado, T.R. 2013. Otros nutrientes importantes en la nutrición vegetal (titanio, silicio, cobalto, selenio). 2do Congreso Internacional de Nutrición y Fisiología Vegetal Aplicada. INTAGRI. Guadalajara, Jalisco, México.
- Manterello, G. P., C. Gómez-Gaete, J. Luengo C., R. Godoy R. y R. Pinto S. 2014. Desarrollo de nanopartículas biodegradables de capsaicina y evaluación de cesión del principio activo desde formulaciones semisólidas. Revista Farmacológica de Chile 7 (2): 41-49.
- Melgar, R. 2012. Fertilizantes, enmiendas y productos nutricionales. Revista Latinoamericana 23 (16): 52-54
- Meléndez, G. y E. Molina. 2002. Fertilización foliar: Principios y aplicaciones. Memoria. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 145 pp.
- Méndez-Arguello, B., I. Vera-Reyes, E. Mendoza-Mendoza, L.A. García-Cerda, B. A. Puente-Urbina y R.H. Lira-Saldivar. 2016. Promoción del crecimiento en plantas de *Capsicum annuum* por nanopartículas de óxido de zinc. Revista Electrónica Nova Scientia No. 17 vol. 8 (2): 140-156.
- Miranda-Tassara, A., C. Gómez-Gaete, P. Toledo-Ramírez y S. Mennickent-Cid. 2014. Optimización de la elaboración de micropartículas poliméricas mediante diseño experimental y su aplicación en la encapsulación de rivastigmina. Poster. III Congreso Nacional de Nanotecnología. Puerto Varas, Chile. 1pp.
- Mora-Huertas, C.E., H. Fessi y A. Elaissari. 2009. Polymer-Based nanocapsules for drug delivery. International Journal of Pharmaceutics 385 (2010). 113-142.
- Mroginski, L., P. Sansberro y E. Flaschland. 2010. Capítulo I. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Buenos Aires, Argentina. 650pp.
- Nair, R., S.H. Varghese, B.G. Nair, T. Maekawa, Y. Yoshida y DS Kumar. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. Plant Science 179: 154-163.
- Navarro, M., G. Febles y V. Torres. 2012. Bases conceptuales para la estimación del vigor de las semillas a través de indicadores del crecimiento y el desarrollo inicial. Pastos y Forrajes 35 (3): 233-246.
- Negrón-Ríos, G. 2015. Sobre las microesferas o micropartículas. Carta Periodica. Servicio de Extensión Agrícola (1): 1-13.
- Nolasco-Bethencourt, J., A. Outeiriño-Pérez, J. Monzo-Berenguer, A. González Benavente-García y J. López-Marín. 2005. Aplicación de fertilizantes

- encapsulados en cultivo de brócoli en Murcia. *Horticultura Internacional* 50: 10-14
- Olivares-Pascual, J. 2015. Fertilización biológica de las plantas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 1-3.
- Olivera-Ortega, V. Z., M. A. Gutiérrez-Espinoza, J. A. Gutiérrez-Espinoza y M. Andrade-Rodríguez. 2000. Cultivo *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro* 12 (3): 75-80.
- Ogunleye, A., A. Bhat, V. U. Irerere, D. Hill, C. Williams y I. Radecka. 2014. Poly- $\gamma$ -glutamic acid: production, properties and applications. *Microbiology* 161. 1-17.
- Pereira, A.E.S., I.S. Herrera, S.Z.V. Betancourt, A.S.A. Pérez, J.R. García y L.F. Fraceto. 2016. Carrier system base don  $\gamma$ -polyglutamic acid/chitosan nanoparticles for the plant growth regulator gibberellic acid; characterization and evaluation of biological activity. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Química Aplicada. Saltillo, Coahuila, México. 68pp.
- Ramírez-Malagón, R., A. Borodanenko, N. Ochoca-Alejo, L. Pérez-Moreno, J.L. Barrera-Guerra y H. Gordon-Núñez Palenius. 2007. Efecto del genotipo, ambiente y ácido húmico en el cultivo *in vitro* de anteras de trigo. *Revista Fitotecnista de México* 30 (2): 159-165.
- Recasens, Ll. 2008. Los fertilizantes de liberación controlada. *Revista Horticultura* 3. 74-83.
- Reis, E.A., E.P. Bispo, M.H.M. Rocha-Leão y S.G.F. Leite. 2014. Liberação lenta de nitrogênio e fósforo a partir de composto polimérico de alginato de cálcio e amido modificado para fines de bioestimulo. XX Congreso Brasileiro de Engenharia Química. 1-8.
- Rico, C.M., J.R. Peralta-Videa y J.L. Gardea-Torresdey. 2015. Chemistry, biochemistry of nanoparticles, and their role in antioxidant defense system in plants. En: *Nanotechnology and plant sciences*. 1-17.
- Rodríguez-Félix, D.E. 2006. Síntesis y caracterización de hidrogeles de redes semi-interpenetradas, basadas en poli (acrilamida) y poli (ácido- $\gamma$ -glutámico). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Química Aplicada, Saltillo, Coahuila, México. 141pp.
- SAGARPA. 2012. El suelo y la producción agropecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, Distrito Federal. 1-3.

- Sancho, H. 1994. Curvas de absorción de nutrientes: importancia y uso de los programas de fertilización. *Informaciones Agronómicas* 36: 11-13.
- Sarmiento, B., D. Ferreira, F. Veiga y A. Ribeiro. 2006. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers* 66 (1): 1-7.
- Seijo, G., G. I. Lavia, G. Robledo, A. Fernández y V. G. Solís-Neffa. 2010. Capítulo III. LA citogenética molecular e inmunocitogenética en el estudio de los genomas vegetales. En. *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Buenos Aires, Argentina. 650 pp.
- Shah, V. e I. Belozerova. 2009. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water Air Soil Pollut* 197:143-148.
- Shu, K., Q. Chen, Y. Wu, R. Liu, H. Zhang, S. Wang, S. Tang, W. Yang y Q. Xie. 2016. Abscisic acid-insensitive 4 negatively regulates flowering through directly promoting *Arabidopsis* flowering locus c transcription. *Journal of Experimental Botany* 67 (1): 195-205.
- Siddiqui, M.H. y M.H. Al-Whaibi. 2014. Role of nano-SiO<sub>2</sub> in germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* seeds Mill.). *Saudi Journal of Biological Sciences* 21:13-17.
- Siddiqui, M.H., M.H. Al-Whaibi, M. Firoz y M. Y. Al-Khaishany. 2015. Role of nanoparticles in plants. En: *Nanotechnology and plant sciences*. 19-35.
- Sinergia. 2003. Producción respetuosa en viticultura "Impactos ambientales en agricultura". *Life Sinergia* 03 (0085): 1-11.
- Suriyaprabha, R. G. Karunakaran, R. Yuvakkumar, P. Prabu, V. Rajendran y N. Kannan. 2012a. Growth and physiological responses of maize (*Zea mays* L.) to porous silica nanoparticles in soil. *Journal Nanoparticle Research* 14: 1294-1296.
- Suriyaprabha, R., G. Karunakaran, R. Yuvakkumar, V. Rajendran y N. Kannan. 2012b. Silica nanoparticles for increased silica availability in maize (*Zea mays* L.) seeds under hydroponic conditions. *Current Nanoscience* 8: 1-7.
- Thul, S.T. y B. K. Sarangi. 2015. Implications of nanotechnology on plant productivity and its rhizospheric environment. En: *Nanotechnology and plant Sciences* 1: 37-53.

- Tjalling-Holwerda, H. 2006. Guía de manejo nutrición vegetal de especialidad "Tomate". En: Cropkit. The Worldwide Bussiness Formula. 1-84.
- Urbina-León, A., M. A. Herradora-Lozano y R. Olea. 2016. Fósforo, un problema mundial urgente. BMeditores.mx. Disponible On Line: <http://bmeditores.mx/problema-urgente/>
- Varela, S.A. y A. Aparicio. 2011. Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. Serie técnica "Sistemas Forestales Integrados" (3): 1- 10.
- Yang, L. y D. Watts. 2005. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. Toxicology Letters 158: 122-132.
- Yang, F., F. Hong, W. You, C. Liu, F. Gao, C. Wu y P. Yang. 2006. Influences of nano-anatase TiO<sub>2</sub> on the nitrogen metabolism of growing spinach. Biological Trace Element Research 110: 179-190.
- Zamudio-González, B., A. A. Vázquez, G. Alcántara-González, J. D. Etchevers-Barra, M. Tadeo-Robledo. 2011. Movimiento vertical de fósforo en suelos arenosos con fertirriego y uso de mejoradores. Terra Latinoamericana 29 (3): 249-258.
- Zapata, F. y R. N. Roy. 2007. Capítulo 1 Introducción. En: Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. Boletín FAO, Fertilizantes y Nutrición Vegetal (13): 1-10.
- Zhang, P., Y. Ma y Z. Zhang. 2015. Interactins between engineered nanomaterials and plants: Phytotoxicity, uptake, translocation and biotransformation. En: Nanotechnology and plant sciences. 77-99.
- Zheng, L., F. Hong, S. Lv y C. Liu. 2004. Effect of Nano-TiO<sub>2</sub> on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. Biological Trace Element Research 101: 1-9.

## **XI. ANEXO**

### **Anexo I. Protocolo propuesto por Rodríguez-Félix (2006). Síntesis del Poliácido- $\gamma$ -glutámico puro a partir del *Bacillus licheniformis*.**

#### **1.1. Preparación del medio de cultivo para el desarrollo de la bacteria.**

La preparación del medio de cultivo “caldo nutritivo” en la cual se inoculó la cepa de *Bacillus licheniformis*. Dicha formulación se muestra en la Tabla 1, agregando el glicerol en una probeta y de la cual se aforó a 1 L. Posteriormente, se mezclaron los fertilizantes y se finalizó agregando los ácidos, agitando

cuidadosamente y ajustando a un pH 7. Todo esto en un matraz. Una vez preparado el medio de cultivo se esterilizó en la autoclave por 15 min a una temperatura de 121°C y se dejó enfriar para inocular la cepa bacteriana.

Tabla 1. Reactivos y cantidades a utilizar por litro de agua destilada para la elaboración del medio de cultivo líquido donde se inoculará la bacteria *Bacillus licheniformis*.

Reactivos/sustancias		Cantidad en g/L
Ácido L-glutámico	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	20
Ácido cítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	12
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	80
Cloruro de amonio	NH <sub>4</sub> Cl	7
Fosfato ácido de potasio	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.5
Cloruro de hierro (III) hexahidratado	FeCl <sub>3</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0.004
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0.15
<sup>T</sup> Sulfato de magnesio hidratado	MnSO <sub>4</sub> * (H <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>	5.7 µg/L

<sup>T</sup>El Mn<sup>+2</sup> afecta la producción de masa molecular y estereoquímica a 33.8 µg/L (Rodríguez-Félix, 2006), puede variarse para conseguir la composición enantiomérica D/L deseada (Portilla-Arias *et al.*, 2012).

### 1.1.2. Inóculo de la bacteria y condiciones de crecimiento.

Se inoculó la cepa de *B. licheniformis* dentro de una campana de flujo laminar al 1% (v/v) del medio de cultivo para su crecimiento.

Se dejó crecer en una incubadora con agitación Shaker (New Brunsh modelo G25 LOND, ING) a 37°C y 250 rpm en un tiempo estimado de 72 h.

Pasado el tiempo de crecimiento se ajustó el medio de cultivo a un pH 3.5, centrifugándolo (Centrífuga Beckman Allegra 25R, USA) a 14,000 rpm de 20 a 30 min a 10°C.

### **1.1.3. Aislamiento del poli (ácido- $\gamma$ -glutámico) en forma sal.**

Una vez obtenido el sobrenadante se le agregó acetona 1:1 (v/v) y se aplicó agitación hasta la formación del  $\gamma$ -PGA sólido (generalmente viscoso). Para finalizar se diluyó el  $\gamma$ -PGA sólido en agua destilada con una concentración de 2-20% (p/v), congelándolo (congelador modelo 12101-50 cole Parmer, USA). Posteriormente, se realizó un secado del polímero ( $\gamma$ -PGA) por liofilización (Liofilizador Labconco modelo 7, CAN) para obtener el  $\gamma$ -PGA en forma sal ( $\gamma$ -PGAs)

### **1.1.4. Purificación del poli (ácido- $\gamma$ -glutámico) sal por membrana de diálisis.**

Para la purificación del  $\gamma$ -PGAs, se utilizaron tubos de membradas de diálisis, las cuales se cortaron de 20 cm y se pusieron a hervir por 10 min en una parrilla, esto en una solución que contiene 2 % (p/v) de bicarbonato de sodio y 1 mM de EDTA (pH 8). Posteriormente se enjuagaron los tubos con agua destilada y se pusieron a hervir de nuevo por 10 min con 1 mM de EDTA (pH 8). Los tubos se dejaron enfriar y se conservaron a 4°C asegurándose que siempre se encontraran sumergidos en la solución. Seguido se enjuagaron con agua destilada.

Se preparó una solución de  $\gamma$ -PGAs al 2 % (p/v) con agua destilada y se añadió en las membranas, amarrando ambos extremos a unas pesas y así, se mantuvieran sumergidas en agua desionizada con un pH ajustado a 3.35. La diálisis duró 16 h con intercambios de agua cada 4 h y finalmente se liofilizó. Obteniendo en  $\gamma$ -PGAp.

## **Anexo II. Métodos de encapsulamiento.**

### **2. Partículas a sintetizar**

#### **2.1. Pre-gelificación ionotrópica (nanopartículas)**

Se preparan cuatro soluciones:

- Solución 1. Se disuelven 18 mg de trípoli fosfato de potasio en 250 mL de agua y se ajusta el pH en 5 (4.9).
- Solución 2. Se disuelven 50 mg de  $\text{CaCl}_2$  en 25 mL de agua.

- Solución 3. Se disuelven 0.035 g de quitosán en 50 mL de ácido acético al 1M (2.86 mL en 50 mL de agua). Se deja disolviendo toda la noche y se filtra (22  $\mu$ m).
- Solución 4. Se agregan de  $\gamma$ -PGAp (0.031 %, pH 4.9) a 250 mL de agua.

Con una bomba peristáltica se mezcló la solución 2 y se agitó durante 60 min. A esta solución posteriormente se le agregó 59 mL de la solución 4 y se le añadieron 12.5 mL de la solución 3 dejándose mezclar por 90 min.

Las NPs se prepararon a una concentración 1:1, añadiendo la solución 1 con el fertilizante comercial, el cual fue añadido después de la adición de la solución 2 y antes de la solución 3.

Se sinterizaron NPs sin el fertilizante P.

## **2.2. SPRAY-DRY (micropartículas)**

Se requieren preparar 4 soluciones:

- Solución 1: Se prepara una solución de 0.1 M de NaOH en agua desionizada.
- Solución 2: En 25 mL de agua desionizada se agregan 50 mg de CaCl<sub>2</sub> mezclando hasta disolver.
- Solución 3: En 50 mL de agua desionizada se agregan 2 g de fosfato monopotásico mezclando hasta disolver.
- Solución 4: En 410 mL de agua desionizada se agregan 2 g de PGA (poliácido glutámico) mezclando hasta formar un fluido ligeramente viscoso y parcialmente disuelto con tonalidad blanca.

A la solución 4 se le agrega poco a poco la solución 1 en agitación constante para cambiar el pH de la solución 4, de pH ácido a básico (aproximadamente de 5 a 12). Al término, se agrega por goteo 3.75 mL de la solución 2 manteniendo la agitación, y al terminar se agrega totalmente la solución 3 por goteo, al agregar esta última disolución, la solución 4 tenderá a un pH neutro-ácido, solo se tiene que ajustar a un pH neutro con la solución 1. Se deja agitando durante una hora esta solución.

A la espera de la hora antes mencionada, se enciende el atomizador por secado (mini spray dryer modelo B-290 de Büchi) a las siguientes condiciones, dejándolo calentar durante la misma hora. La tobera de secado se utiliza con una punta de pulverización de 0.7 mm con su tapa de 1.4 mm de diámetro.

Tabla 2. Condiciones operacionales.

Temperatura	Presión de aire	Flujo de aire	Bombeo	Aspirado	Aguja de limpieza
140 °C	5 bares	473 L/h	10%	-40 milibares	Posición 3

### **Anexo III. Condiciones óptimas de crecimiento.**

#### **3. Nutrición de la *Arabidopsis thaliana in vitro*.**

La semilla se siembra en condiciones de esterilidad en cajas de Petri que contienen un medio MS modificado (Tabla 3).

Tabla 3. Medio MS modificado para el crecimiento de la *A. thalassiana in vitro* (López-Bucio *et al.*, 2002).

Compuesto	Nombre comercial	Cantidad
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Nitrato de amonio	2 mM 1 mM optimo
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de potasio	10 µM deficiente
KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potasio	1.9 mM
CaCl <sup>*</sup> ·2H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio	0.3 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado	0.15 mM
KI	Yoduro de potasio	5 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico	25 µM
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	Sulfato de manganeso	0.1 mM
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sulfato de Zinc	0.3 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Molibdato de sodio	1 µM
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.1 µM
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.1 µM
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sulfato ferroso heptahidratado	0.1 µM
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	Sal de sodio de EDTA	0.1 mM
	inositol	10 mg L <sup>-1</sup>
	glycine	0.2 mg L <sup>-1</sup>
	Sucrose	0.5%
	Agar	1%
		pH 5.7

Tabla 4. Comportamiento del estado físico (pH y solidez) del medio de cultivo MS al ser sometido a diferentes concentraciones de γ-PGAp: agua destilada, en diferentes formas de aplicación a pH 5.7 y 8.

pH inicial del MS	Solución 0.1 mg de γ-PGAp: 1mL Agua destilada	Inmediatamente después de adicionar el γ-PGAp	Inmediatamente después de esterilizar	Al solidificar
	1:1	3.61*	4.13*	4.83

5.7	2:1	2.49*	3.29*	4.13*
	1:2	3.73*	4.78	4.77
<hr/>				
8	1:1	7.17	7.34	7.43
	2:1	6.70	6.30	7.63
	1:2	7.00	7.00	6.97
<hr/>				

\*Medio MS licuado.