



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias (Ingeniería de Biosistemas)

“Crecimiento y desarrollo de plantas de chile (*Capsicum annum* L.) con aplicación de sílice mesoporosa”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Ingeniería de Biosistemas)

Presenta:

Ernesto Magaña Lopez

Dirigido por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

SINODALES

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Presidente

Dr. Rufino Nava Mendoza

Secretario

Dr. Irineo Torres Pacheco

Vocal

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez

Suplente

Dr. Enrique Rico García

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Octubre de 2019

México

RESUMEN

El silicio (Si) es un importante elemento en la nutrición vegetal y se conoce una amplia variedad de efectos positivos al ser utilizados en plantas (promotor de crecimiento, resistencia a estrés y temperaturas extremas, mitiga el efecto tóxico de metales, etc.). La sílice mesoporosa (MS) es una sustancia a base de dióxido de silicio (SiO_2) cuya estructura porosa ha permitido desde su descubrimiento el transporte de otras sustancias y nanomateriales en su interior. En esta investigación se sintetizó sílice mesoporosa con 2 morfologías distintas (SBA-15 y SBA-16), debido a que se ha observado que el efecto de los materiales nanotecnológicos es distinto, de acuerdo a la dosis, método de aplicación, morfología, entre otras. Se evaluó el efecto intrínseco de éstos materiales para determinar si el material es seguro de utilizar y si tiene efectos benéficos por sí mismo, en el crecimiento y desarrollo de plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) comparados con un tratamiento control. Después de desarrollar experimentos de germinación, de producción en invernadero, de toxicidad y exposición a estrés abiótico en diversas condiciones se encontró que estos materiales se consideran biocompatibles en la mayoría de las circunstancias con algunos efectos fitotóxicos en dosis bajas, pero importantes efectos benéficos (como promotores de crecimiento o eustresores) dependiendo de la etapa fenológica, de la dosis utilizada y de la morfología de la sílice sintetizada, así como un aumento de la tolerancia al frío sin producirse importantes acumulaciones en los tejidos.

Palabras clave: Sílice mesoporosa, Chile Jalapeño, Biocompatibilidad, Liberador de sustancias, Nanotecnología

ABSTRACT

Silicon (Si) is an important element in plant nutrition, and a wide variety of positive effects are known when used in plants (growth promoter, resistance to stress and extreme temperatures, mitigates the toxic effect of metals, etc.). Mesoporous silica (MS) is a substance based on silicon dioxide (SiO_2) whose porous structure has allowed since its discovery the transport of other substances and nanomaterials inside. In this investigation, mesoporous silica was synthesized with 2 different morphologies (SBA-15 and SBA-16), because it has been observed that the effect of nanotechnological materials is different, according to the dose, method of application, morphology, between others. The intrinsic effect of these materials was evaluated to determine if the material is safe to use and if it has beneficial effects on its own, on the growth and development of chili plants (*Capsicum annuum* L.) compared to a control treatment. After developing germination experiments, greenhouse production, toxicity and exposure to abiotic stress under various conditions, it was found that these materials are considered biocompatible in most circumstances, with some phytotoxic effects at low doses, but important beneficial effects (as growth promoters or eustressors) depending on the phenological stage, the dose used and the morphology of the synthesized silica; as well as an increase in cold tolerance. Without major accumulations in the tissues.

Key words: Mesoporous silica, Jalapeño Pepper, Biocompatibility, Substance release, Nanotechnology

A mis padres, por su trabajo duro para brindarme las oportunidades que me han llevado al día de hoy. Y a mi hermana por alentarme a siempre llegar más lejos e inspirarme a ser una mejor persona

Gracias

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado con la Beca Nacional y Beca Mixta para poder realizar exitosamente mis estudios de posgrado.

A mis compañeros de la maestría (Miguel, Byanka, Asael, Betsie, Ana y Valente), con quienes siempre superamos los retos que se nos presentaron “codo a codo”, y que se volvieron amigos de aventuras dentro y fuera de la escuela.

A mis profesores, que con sus consejos y ejemplos nos inspiran y guían.

A mis compañeros del Campus Amazcala, que tanto en laboratorios como en los invernaderos, me mostraron su apoyo cuando lo necesité.

Al equipo del Campus Aeropuerto, el Dr. Rufino Nava Mendoza y a la M.C. Viviana Palos Barba, por el apoyo en el Laboratorio de Síntesis de Materiales. Así como a la Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez, por su apoyo en el Laboratorio de Metabolitos y Nanocompositos.

Al equipo de The Connecticut Agricultural Experiment Station, el Dr. Jason C. White, Dra. Nubia Zuverza Mena, Dr. Roberto de la Torre Roche, Dr. Wade H. Elmer y Mr. Peter W. Thiel, por su apoyo en la estancia de investigación en New Haven (CT, USA) que complementó este proyecto.

Al Dr. Ramón G. Guevara González, por el apoyo que desde un inicio me brindó, fue un honor estar en sus clases. Agradezco la oportunidad y confianza de permitirme llevar a cabo este proyecto bajo su tutela.

A Semillas Harris Moran Mexicana, S.A. de C.V., por su apoyo en el proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) y a la Facultad de Ingeniería, por impulsar programas de actualidad que atienden problemas reales y nos ofrecen la oportunidad de estar a la vanguardia en cada área del conocimiento.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE CUADROS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
La nanotecnología en la agricultura	5
La sílice mesoporosa como herramienta de la nanotecnología	7
Crecimiento y desarrollo del chile cultivado en México	9
Tolerancia al estrés ambiental	12
III. HIPÓTESIS	13
IV. OBJETIVOS	13
V. METODOLOGÍA	14
Síntesis y caracterización de sílice mesoporosa	14
Evaluación de germinación de semillas y crecimiento de plántulas	17
Sílice mesoporosa en el crecimiento y desarrollo del chile	22
Pruebas moleculares y metabolismo especializado	27
Efecto de la sílice mesoporosa ante un factor de estrés abiótico	31
Prueba de fitotoxicidad (estancia de investigación)	32
Consideraciones éticas	36

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Síntesis y caracterización de sílice mesoporosa	38
Evaluación de germinación de semillas y crecimiento de plántulas	43
Sílice mesoporosa en el crecimiento y desarrollo del chile	46
Efecto de la sílice mesoporosa ante un factor de estrés abiótico	48
Prueba de fitotoxicidad (estancia de investigación)	50
VII. CONCLUSIONES	54
Sugerencias	55
VIII. LITERATURA CITADA	56
ANEXOS	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
4.1 Mezclas con las condiciones más apropiadas para la amplificación de los oligonucleótidos	29
5.1 Resultados morfológicos y genéticos en la germinación de semillas del experimento con tratamientos a base de SBA-15	44
5.2 Resultados morfológicos y genéticos en la germinación de semillas del experimento con tratamientos a base de SBA-16	45
5.3 Resultados morfológicos, metabólicos y genéticos del crecimiento y desarrollo de plantas de chile con tratamientos a base de SBA-15	46
5.4 Resultados morfológicos, metabólicos y genéticos del crecimiento y desarrollo de plantas de chile con tratamientos a base de SBA-16	47
5.5 Evaluación de la producción, niveles de clorofila y metabolismo especializado de plantas tratadas con sílice mesoporosa SBA-15 ante condiciones de estrés abiótico (frio)	49
5.6 Evaluación de la producción, niveles de clorofila y metabolismo especializado de plantas tratadas con sílice mesoporosa SBA-16 ante condiciones de estrés abiótico (frio)	49
5.7 Evaluación de fitotoxicidad en variables morfológicas, niveles de clorofila y de producción en plantas tratadas con sílice mesoporosa SBA-15	51
5.8 Evaluación de fitotoxicidad en variables morfológicas, niveles de clorofila y de producción en plantas tratadas con sílice mesoporosa SBA-16	51
5.9 Análisis elemental por ICP-OES (Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente) de plantas tratadas con sílice mesoporosa SBA-15	52
5.10 Análisis elemental por ICP-OES (Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente) de plantas tratadas con sílice mesoporosa SBA-16	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Etapas fenológicas del chile	11
4.1	Proceso de síntesis de la sílice mesoporosa SBA-15	14
4.2	Proceso de síntesis de la sílice mesoporosa SBA-16	15
4.3	Procedimiento de preparación de muestras para observación de materiales mesoporosos por medio de la microscopía electrónica de barrido (SEM)	16
4.4	Diseño experimental para probar el efecto de la sílice mesoporosa en la germinación de semillas de chile jalapeño	17
4.5	Vista aérea del campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, señalando el laboratorio de fisiología vegetal	18
4.6	Características de la semilla de chile jalapeño Dante	19
4.7	Preparación del experimento de germinación	20
4.8	Plántulas de chile jalapeño germinadas en caja de Petri sobre papel filtro	21
4.9	Diseño experimental para probar el efecto de la sílice mesoporosa en chile jalapeño	23
4.10	Invernadero de uso experimental, utilizado para probar la MS en chile jalapeño	24
4.11	Cronología de actividades y etapas fenológicas del chile jalapeño en invernadero	24
4.12	Procedimiento para la extracción de ARN de tejidos de chile	27
4.13	Condiciones térmicas durante enero de 2019 en Amazcala, El Marqués, Qro	32
4.14	Diseño experimental para probar el efecto de la sílice mesoporosa en altas concentraciones sobre chile jalapeño	33
4.15	Preparación de plántulas y aplicación de tratamientos para el experimento de fitotoxicidad	35
5.1	Apariencia de los materiales nanoestructurados, tras la calcinación de la sílice mesoporosa al final del procedimiento de síntesis por el método Sol-Gel en el Campus Aeropuerto de la UAQ	38
5.2	Resultados de la caracterización estructural de los materiales SBA-15 y SBA-16	39
5.3	Resultados de la caracterización eléctrica de suspensiones acuosas con sílice mesoporosa	40
5.4	Observación de SBA-15 con poros en arreglo hexagonal altamente ordenados, a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM)	41
5.5	Observación de SBA-16 con poros esféricos en arreglo cúbico, a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM)	42

5.6	Muestras en seco de aglomeraciones de sílice mesoporosa de tipo a) SBA-15 y b) SBA-16, vistas con microscopía electrónica de barrido (SEM)	42
5.7	Plántulas control (a) comparadas con las plántulas del mejor tratamiento de SBA-15 (b) y de SBA-16 (c), las cuales presentan una menor diferencia de crecimiento	45
5.8	Comparación del efecto promotor de crecimiento con el efecto eustresor ante un factor de estrés abiótico (frio) en plantas de chile sometidas a tratamientos con sílice mesoporosa	50
A.1	Expresión relativa de los genes a) Mn-SOD, b) POD, c) PAL y d) CHS como respuesta a los tratamientos con partículas de sílice mesoporosa en plantas de chile	63
A.2	Metabolitos especializados en respuesta a los tratamientos con partículas de sílice mesoporosa SBA-15 en plantas de chile	63
A.3	Metabolitos especializados en respuesta a los tratamientos con partículas de sílice mesoporosa SBA-16 en plantas de chile	64
A.4	Longitud de plántulas de chile jalapeño, evaluadas al día 14 después de la siembra, con tratamientos de sílice mesoporosa, donde se observan efectos adversos en una de las dosis más bajas.	64
A.5	Conteo de hojas de plantas de chile jalapeño, tratadas con sílice mesoporosa. Donde al observar los tratamientos de cada tipo de SBA por separado, se observa un comportamiento hormético inverso.	65

I. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es la ingeniería de sistemas funcionales a escala nanométrica y comenzó con la capacidad de ver, manejar e intervenir características de la materia en la escala de 1 a 100 nm (Caruso *et al.*, 2014). Los materiales que se trabajan a esa escala son denominados nanomateriales (NMs) y el interés en éstos, es debido a que su tamaño les confiere características diferentes a las que tendrían estos mismos materiales a una escala mayor (Soto-Chilaca y López-Malo, 2011; Rauscher *et al.*, 2019).

Desde su descubrimiento, la nanotecnología se ha utilizado desde la medicina y electrónica hasta la industria alimenticia y agrícola, donde por ejemplo, el efecto que causan las nanopartículas (nanomateriales con todas sus dimensiones dentro de la escala nanométrica y generalmente son esféricas) en las plantas difiere de acuerdo su composición, dosis, tamaño, técnica de aplicación, propiedades físicas y químicas tanto de las NPs como de las plantas con las que interactúa (Ma *et al.*, 2010). En la última década algunos nanomateriales, nanoestructuras y nanopartículas, incrementaron su aparición en campos como la biotecnología y agricultura, debido a su elevada área superficial, alta reactividad, tamaño de poros y morfologías configurables (Lárez-Velásquez, 2015; Siddiqui *et al.*, 2015).

Inicialmente se estudiaron interacciones entre la nanotecnología y las plantas, en etapas fenológicas u organelos específicos, utilizando algunas de los NMs más estudiados, donde se encuentran las NPs de óxido de zinc, de oro, de plata, de dióxido de titanio, de dióxido de silicio y algunas nanoestructuras como los nanotubos de carbono (CNTs) con forma cilíndrica (Siddiqui *et al.*, 2015). Estos últimos, llegando a duplicar el número de flores y frutos en tomate (Khodakovskaya *et al.*, 2013).

Varios estudios sugieren que, las nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs), aumentan el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los nanotubos de carbono (CNTs) han adquirido una importante posición debido a sus únicas propiedades mecánicas, eléctricas, termales y químicas, en estudios enfocados a

animales y humanos, pero también hay información disponible que involucra células vegetales y su metabolismo, penetrando en la pared celular. Utilizando nanopartículas de oro (AuNPs), se encuentran algunos estudios de su interacción con las plantas, donde se indujo toxicidad en las plantas. Las nanopartículas de plata (AgNPs) se han estudiado de manera más extensa en células animales y con microorganismos, pero hay pocos estudios en plantas, algunos indicando tener tanto efectos positivos como negativos, aumentando la síntesis de proteínas y carbohidratos, pero disminuyendo el contenido de fenoles y la actividad de catalasas y peroxidasas. Similar a las AgNPs se encuentran las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂NPs), estudiadas en los organismos similares, pero falta aún información sobre su efecto en la germinación y desarrollo radicular (Siddiqui *et al.*, 2015).

Finalmente están las nanopartículas a base de silicio, un elemento abundante, pero que se pierde fácilmente en el suelo; su absorción es solamente como ácido orto silícico (H₂SiO₄); no es esencial pero presenta interesantes efectos benéficos para las plantas. Las NPs de dióxido de silicio (SiO₂NPs), han provocado efectos desde la germinación de semillas hasta el crecimiento y desarrollo temprano en algunas especies, mejorando la tasa fotosintética y la síntesis de pigmentos fotosintéticos (Siddiqui *et al.*, 2015). La sílice mesoporosa (MS), es un material constituido por una matriz de sílice (SiO₂) con canales o cavidades más o menos regulares en su interior de un diámetro comprendido entre los 2 y 50 nm, lo que le confiere una gran superficie específica, ofreciendo una amplia gama de aplicaciones dentro de la nanotecnología, como puede ser la liberación controlada de diversas sustancias (Buzea *et al.*, 2007).

Es debido a la gran diversidad de nanomateriales que se sintetizan, desarrollan e introducen actualmente al mercado, que se hace necesario estudiarlos, caracterizarlos y evaluar su interacción con el entorno que está expuesto a ellos, como la vegetación silvestre o cultivada, observando su respuesta en variables tanto de crecimiento (peso, altura, diámetro de tallo, área foliar, composición mineral, entre otras) como de desarrollo, tomando en cuenta la

fenología, floración, rendimiento y calidad de fruto, así como la expresión genética y metabolismo especializado (Tucuch-Haas *et al.*, 2012), entendiéndose como crecimiento el aumento en masa causado por la multiplicación celular y el desarrollo como el proceso que conduce a la adquisición de nuevas funciones o diferenciación celular. Para que al final de las investigaciones, se conozcan los riesgos y beneficios que implica el uso de uno o varios materiales nanoestructurados y sus potenciales aplicaciones (Ramos, 1986).

En general la nanotecnología ha llegado a ofrecer ventajas y alternativas ante sus contrapartes de mayor escala, y cualquier campo de aplicación que busque mejorar la producción, eficiencia o seguridad debe considerar las ventajas que esta nueva tecnología ofrece. Y la agricultura lo requiere, ya que tras la llegada de la revolución verde, se impulsó la aplicación desmedida de insumos agrícolas que causaron graves problemas, tanto al ambiente y al suelo cultivable, como a la propia salud humana.

La población mundial se ha duplicado en menos de 60 años, cada vez surgen nuevos problemas, los cuales ya sean de tipo antropogénico o no, también han conducido a generar soluciones y cambios de pensamiento, por la preocupación de continuar proveyendo de alimentos a los 7, 700 millones de personas que actualmente están poblando la tierra, pero ahora con técnicas más racionales y sostenibles, entre ellas la producción forzada y la agricultura de precisión, que busca proveer con lo necesario a los cultivos sin excesos ni deficiencias, apoyado de herramientas como la nanotecnología en nanosensores, nanopartículas metálicas, liberación controlada de sustancias y mecanización de los cultivos (Duhan *et al.*, 2017; United Nations, 2019).

Actualmente en México, se estudian aplicaciones de la nanotecnología como liberación de nanofungicidas, nanofertilizantes, promotores de germinación y de crecimiento, así como sus posibles efectos fitotóxicos, de bioacumulación en tejidos y biosíntesis de nuevos NMs (CIQA, 2017; Ponce-García *et al.*, 2019). Es así

como la nanotecnología y sus aplicaciones en la agricultura, genera un impacto real en cualquier lugar donde se produzcan o manejen alimentos.

Los nanomateriales se manejan a una escala casi imperceptible, y para incursionar en el estudio de aplicaciones agrícolas, se debe estudiar los transportadores con los que se liberan éstas sustancias, que algunas veces también son nanométricas. Las investigaciones suelen iniciar en ambientes controlados, para conocer la naturaleza de su interacción. La producción en invernaderos ofrece las condiciones apropiadas para conducir los estudios iniciales, y uno de los máximos exponentes de la agricultura protegida en México es el chile con su amplia diversidad, lo que ha generado un importante respaldo de información cotejable obtenida por medio de la investigación. El chile más cultivado es *Capsicum annum* L. con diferentes variedades como son el jalapeño, poblano, serrano, pasilla, guajillo y pimiento morrón, se cultiva en casi todo México y participa como uno de los más importantes productos agrícolas exportados, esta hortaliza facilita cotejar resultados con otros cultivos de éste tipo y posteriormente continuar experimentos con otras hortalizas de interés (Aguilar-Rincón, 2012).

Es así, que con esta investigación, se busca determinar si existe un efecto intrínseco sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo de chile, al aplicar los materiales de sílice mesoporosa, y si es así determinar si son positivos o negativos para el cultivo.

II. ANTECEDENTES

La nanotecnología en la agricultura

Nanomateriales

El emergente y fascinante campo de la ciencia que estudia lo que ocurre entre los micrómetros y los angstrom, ha permitido avances tecnológicos en diversas áreas, y sus descubrimientos podrían ser la respuesta a problemas actuales en la agricultura (Siddiqui *et al.*, 2015).

Los nanomateriales tienen propiedades fisicoquímicas únicas. Algunos con el potencial para aumentar el metabolismo de las plantas, entrar en las células vegetales, contener sustancias, microorganismos y hasta material genético. Lo cual ofrece nuevas posibilidades, pero a la par del estudio de sus aplicaciones, la nanotecnología debe estudiar sus consecuencias (Feregrino-Perez *et al.*, 2018).

Tendencias

Con el fin de promover la nanoagricultura sostenible y buscando reducir los efectos tóxicos que actualmente tienen algunos nanomateriales, las tendencias actuales buscan sintetizar NMs biocompatibles, como es el caso del quitosano nanoparticulado o de las nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas utilizando extracto de hoja de lima (Saharan *et al.*, 2015; Mahakham *et al.*, 2017). De hecho, la naturaleza misma es una excelente nanotecnóloga. Nos proporciona una gama de finas partículas, desde cenizas inorgánicas, hollín, azufre y partículas minerales que se encuentran en el aire o en los pozos, hasta las NPs de azufre y selenio producidas por bacterias y levaduras. Todos completamente naturales y, como es lógico, existe un interés creciente en el desarrollo de productos naturales (Griffin *et al.*, 2018)

Las AgNPs fitosintetizadas fueron aplicadas utilizando “priming” (exposición a sustancias bajo condiciones específicas para generar ventajas en escenarios de estrés) en semillas de arroz envejecidas, mejorando significativamente el rendimiento de la germinación y el vigor de las plántulas en comparación con el control sin priming. El “nanoprimering” aumentó el contenido de azúcar soluble para apoyar el crecimiento de las plántulas, estimuló la expresión de genes de acuaporinas en las semillas en germinación e incrementó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que sugiere que tanto las ROS como las acuaporinas juegan un papel importante en la mejora de la germinación de las semillas (Mahakham *et al.*, 2017).

Existen otras nuevas propuestas, que podrían ser útiles al momento de evaluar la residualidad o contaminación por metales pesados, y es que el desarrollo de NPs fluorescentes orgánicas puede ofrecer nuevos quimiosensores que detecten iones metálicos como el cromo, de manera simple, precisa y casi instantánea (Palos *et al.*, 2018).

Nanomateriales a medida

Por otra parte, se encuentran los nanomateriales sintéticos o diseñados mediante ingeniería (ENMs), entre los cuales destacan los formados a base de SiO₂ y TiO₂, que como su nombre lo indica, son materiales inorgánicos de alta uniformidad, diseñados para aplicaciones específicas. Algunos de ellos ya existían, aún antes de que surgiera la nanotecnología tal como ahora la conocemos y actualmente continúa creciendo su importancia. Finalmente vale la pena mencionar que existe otro grupo de NMs no mencionado comúnmente, y son los creados de forma incidental, razón por la cual no existe gran interés en ellos, ya que son subproductos de procesos mecánicos, industriales, combustión, etc. Y generalmente forman parte de la contaminación atmosférica (Colvin, 2003).

Los ENMs a base de sílice han sido atractivos para la agricultura debido a las características únicas de estos materiales. En tomate, calabaza y soja se mejoró

la germinación de semillas. En calabaza se estimuló la respuesta antioxidante a ante un estrés salino. En soja aumentó la capacidad de absorción de agua y nutrientes. En maíz mejoró la disponibilidad de nutrientes. En plántulas de alerce con aplicaciones externas, mejoró el crecimiento, calidad de plántulas y también indujo la síntesis de clorofila. Aplicaciones de SiO₂ bajo estrés abiótico, aumentaron el peso fresco y seco de las hojas, el contenido de clorofila, la acumulación de prolina, aminoácidos libres, contenido de nutrientes y actividad de enzimas antioxidantes, mejorando así la tolerancia de las plantas. En plantas de arroz, la sílice revestida con puntos cuánticos (QDs) promovió el crecimiento de raíces y el desarrollo de la planta, aumentando el intercambio gaseoso y fluorescencia de la clorofila (Siddiqui *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que las partículas de nanosílice absorbidas por las raíces forman laminas en las paredes celulares, lo que puede aumentar la resistencia de la planta al estrés y conducir a mejores rendimientos (DeRosa *et al.*, 2010).

La sílice mesoporosa como herramienta de la nanotecnología

Orígenes y características

En 1992, se informó por primera vez el descubrimiento de materiales mesoporosos M41S, de éstos se han destacado materiales como la SBA-15, obtenida por medios ácidos. Siendo de los materiales adsorbentes mesoporosos más utilizados desde su descubrimiento (Lopes *et al.*, 2013)

La SBA-15 (Santa Barbara Amorphous 15) se desarrolló en 1998, y su creciente interés es debido a su gran área superficial, estructura de poros bien definida, condición inerte, baja toxicidad, alta biocompatibilidad, estabilidad térmica e hidrotérmica, lo que les permite ser utilizadas en catálisis, adsorción, detección química, inmovilización, sistemas de administración de fármacos y separación por técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Lopes *et al.*, 2013).

Otro material adsorbente mesoporoso que ha recibido atención es la SBA-16, con una conformación de nanojaulas esféricas centradas en un cuerpo con disposición cúbica, en la que cada esfera está conectada a ocho esferas y cuyo mecanismo de síntesis es similar a la SBA-15, que a diferencia de la SBA-16, se conforma por poros en paralelo y disposición hexagonal altamente ordenada. El método de síntesis, su orden estructural y el control sobre el tamaño y la forma de sus poros, hacen que las SBA sean materiales versátiles y potencialmente aplicables en muchas áreas de la ciencia y la ingeniería de los materiales (Lopes *et al.*, 2013).

Retos y perspectivas en la síntesis de la sílice mesoporosa

Se ha sintetizado SBA-15 por dos rutas distintas, una es por Sol-Gel y otra por el método hidrotérmico. La ruta Sol-Gel tiene como ventaja principal, la posibilidad de realizarse a relativamente baja temperatura y presión. Sin embargo, el tiempo de hidrólisis y condensación en que se produce, está en general, muy por encima del que requiere la síntesis hidrotérmica. A su vez, este último método a menudo resulta en materiales con áreas superficiales y diámetros de poro mayor que los obtenidos por la ruta Sol-Gel. Su potencial de adsorción varía, en mayor o menor medida, de acuerdo al tipo de biomolécula a adsorber (Lopes *et al.*, 2013).

Varios trabajos reportados acerca de la sílice mesoporosa, reflejan la ardua labor llevada a cabo en la síntesis, transformación y uso del material. Un punto relevante sobre la ventaja de manejar este tipo de materiales mesoporosos es su síntesis a gran escala. Y una manera de reducir los costos de producir estos materiales, es con la utilización de reactivos económicos y accesibles. La fuente más común para obtener silicio es el tetraetilortosilicato (TEOS), pero la sustancia es de precio elevado y cambiarlo por otra sería económicamente más viable para el procedimiento. Por ejemplo algunos trabajos informan que el uso de metasilicato de sodio en un procedimiento ligeramente modificado, da como resultado materiales con características similares a las obtenidas a partir de TEOS (Arellano *et al.*, 2008).

Interacción entre materiales mesoporosos y plantas

Las investigaciones sobre los materiales mesoporosos y las plantas, aún se encuentran en etapas iniciales. El modo de acción para las respuestas biológicas generadas, aún no está claro, así como los sistemas a los que afecta, ya sea positiva o negativamente. Por ejemplo, existe información de un compuesto de sílice mesoporosa que se unió con el fotosistema II (PSII) e indujo actividad estable en una reacción fotosintética, indicando el transporte de electrones impulsado por luz, lo que sugiere que el conjugado PSII-SBA puede tener propiedades para desarrollar fotosensores y sistemas fotosintéticos artificiales (Siddiqui *et al.*, 2015).

Crecimiento y desarrollo del chile cultivado en México

Importancia del chile en México

Por la variedad de condiciones agroclimáticas y su riqueza ambiental, en México existe una amplia variedad de chiles, y se le considera región de origen de muchas de ellas. De las cinco especies domesticadas de *Capsicum*, sobresalen *C. annuum*, *C. chinense* y *C. frutescens*, especies de las que en la actualidad se encuentran poblaciones silvestres con una gran variabilidad morfológica y genética. Siendo las tres especies mencionadas anteriormente, las de mayor extensión cultivada y con mejor rendimiento (Castañon-Nájera *et al.*, 2010). Pero existen casos como el del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de Yucatán, donde aun siendo el estado con mayor superficie cultivada, el rendimiento no es suficiente para cubrir la demanda para la elaboración de salsas y condimentos, debido al bajo nivel de tecnología, los cultivares criollos y calidad de semilla degradados, además de afecciones por plagas y enfermedades, como también escasa intervención en la nutrición y el riego (Tucuch-Haas *et al.*, 2012).

El 80% de la producción del chile cultivado en México, no es exportado, sino consumido dentro del país, algo que señala su importancia y riqueza alimenticia, por lo que se ha convertido en uno de los principales condimentos de la cocina mexicana. En los últimos 10 años el cultivo de ésta hortaliza ha aumentado de manera significativa, debido a la continua y creciente demanda en todas sus presentaciones, tanto en fresco como seco, destinado a consumidores o para la industria de proceso (Rincón, 2012).

Fenología y características del chile

La especie *C. annuum* L. es la más importante en México, donde se encuentra una gran variedad de formas, colores, olores, sabores y picor de los frutos. Es importante y a la vez interesante, poner especial atención en esas características, así como en otras variables de crecimiento y desarrollo, ya que un estudio sobre su comportamiento puede revelar patrones que podemos utilizar como indicadores de interés agrícola. Tal es el caso de la relación entre la madurez del fruto del chile Bell y su semilla, donde existe mayor calidad de semillas cuando el fruto ya cambió completamente de color. En pimiento, se observaron mayores porcentajes de germinación a medida que los frutos fueron más rojos (maduros). Estableciendo indicadores como lo es, que las semillas alcanzan su madurez fisiológica después de cosechadas, al dejarse en reposo de una a seis semanas, dependiendo del tipo de chile. Este grado de madurez y tiempo de reposo poscosecha, afecta la calidad de la semilla (Ayala-Villegas *et al.*, 2014).

Entonces, la vida de una planta comienza a partir de la germinación y posteriormente sigue con la aparición de las raíces y brotes, como primeros signos de crecimiento y desarrollo. De la misma forma que las variables físicas, se ha escrito también a lo largo de la historia sobre los efectos medicinales del chile, con sus primeros reportes en 1494. Hablando de la importancia de la vitamina C, el efectos antiescorbúticos y recientemente sobre las capsaicinas (responsables del sabor picante). Su estudio ahora confirma, que la química del chile al interior de la

planta y sus frutos, responde de acuerdo a su crecimiento y desarrollo, y nos pueden mostrar el estado y comportamiento que tendrá el cultivo (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010).

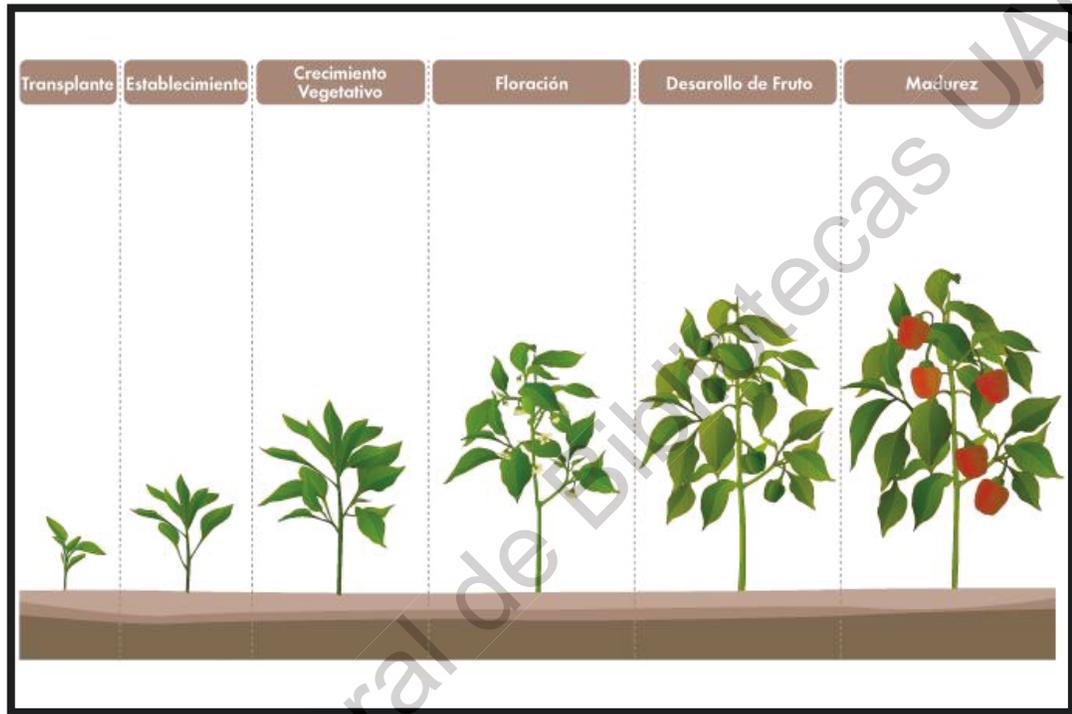


Figura 2.1 Etapas fenológicas del chile (SQM-VITAS, 2019).

Por lo tanto, es importante entender el curso de las etapas y su relación con la nanotecnología, para obtener información específica y confiable, como lo reportado por varios estudios, donde sugieren que los efectos de NMs en la germinación de semillas es dependiente de las concentraciones utilizadas (Siddiqui *et al.*, 2015). Lo que indica un comportamiento de tipo hormético, en el que la exposición a una dosis de algún elemento (como los NMs), inicia un mecanismo de respuesta en un organismo ante el estrés inducido, el cual puede concluir en un efecto tóxico (distresor) o estimulante (eustresor), que termine favoreciendo el crecimiento o la tolerancia del organismo a otros factores de estrés (abióticos, por ejemplo) dependiendo de diversos factores (Poschenrieder *et al.*, 2013).

Tolerancia al estrés ambiental

Todas las interacciones mencionadas, aún están a merced de un elemento prácticamente incontrolable, el medio ambiente. Y éste está cambiando, por lo que al mismo tiempo que se busca actuar de forma sostenible, también se vuelve indispensable considerar preocupaciones que los agricultores tienen mucho antes que las ciencias biológicas aparecieran, como la prosperidad de la agricultura aún en ambientes severos. Por lo que desarrollar alternativas que mejoren la tolerancia a condiciones ambientales hostiles o de estrés, es avanzar en la solución a importantes problemas agrícolas en zonas con condiciones desfavorables y en la prevención de escenarios de riesgo, que podrían presentarse en un futuro en la agricultura a nivel global (Levitt, 1980).

III. HIPÓTESIS

Hipótesis

- ❖ La sílice mesoporosa se ha reportado como transportadora de sustancias, con ella se producirá un efecto benéfico intrínseco a su aplicación en el crecimiento y desarrollo de plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) comparadas con un tratamiento control.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

- ❖ Determinar el efecto de la aplicación de sílice mesoporosa sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo de Chile.

Objetivos específicos

- ❖ Sintetizar y caracterizar sílice mesoporosa con dos morfologías distintas.
- ❖ Evaluar el efecto de la aplicación de sílice mesoporosa en la germinación de semillas, crecimiento y desarrollo de plantas de Chile.
- ❖ Determinar elementos del metabolismo especializado y expresión genética asociada al estrés y a los canales transmembranales de las plantas expuestas a sílice mesoporosa.
- ❖ Evaluar la respuesta al estrés ambiental (por bajas temperaturas) y fitotoxicidad en las plantas expuestas a sílice mesoporosa.

V. METODOLOGÍA

Síntesis y caracterización de sílice mesoporosa

Los materiales mesoporosos SBA-15 y SBA-16 fueron sintetizados con el método Sol-Gel modificado, en un medio ácido para producir un alto ordenamiento poroso (Zhao *et al.*, 1998; Flodström y Alfredsson, 2003). La síntesis fue llevada a cabo en el Laboratorio de Síntesis de Materiales bajo la dirección del Dr. Rufino N. M. con el apoyo de la M.C. Viviana P. B. en el Campus Aeropuerto de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

Síntesis de sílice mesoporosa de tipo SBA-15



Figura 4.1 Proceso de síntesis de la sílice mesoporosa SBA-15.

Para obtener sílice mesoporosa de tipo SBA-15 por la ruta Sol-Gel modificada (Figura 4.1), se utilizó el surfactante neutro “P123”, para la formación de la meso-estructura, el cual fue disuelto en una solución de ácido clorhídrico 4 M con

agua desionizada y agitación constante a 35° C. Una vez disuelto, se comenzó la fase Sol-Gel con la adición del precursor de la sílice, el tetraetilortosilicato (TEOS), manteniendo la reacción a 35° C por 24 h con agitación constante. A continuación se pasó el gel obtenido a otro recipiente, para seguir con el madurado en la mufla por 24 h a 80° C. Se procedió a enfriarse, filtrarse y secarse a temperatura ambiente, y posteriormente a 110° C por 18 h, en la mufla con un aumento de la temperatura de 2° C/min. Finalizando con el calcinado del material a 550° C por 4 h con una rapidez de calentamiento de 1° C/min (Flodström y Alfredsson, 2003).

Síntesis de sílice mesoporosa de tipo SBA-16

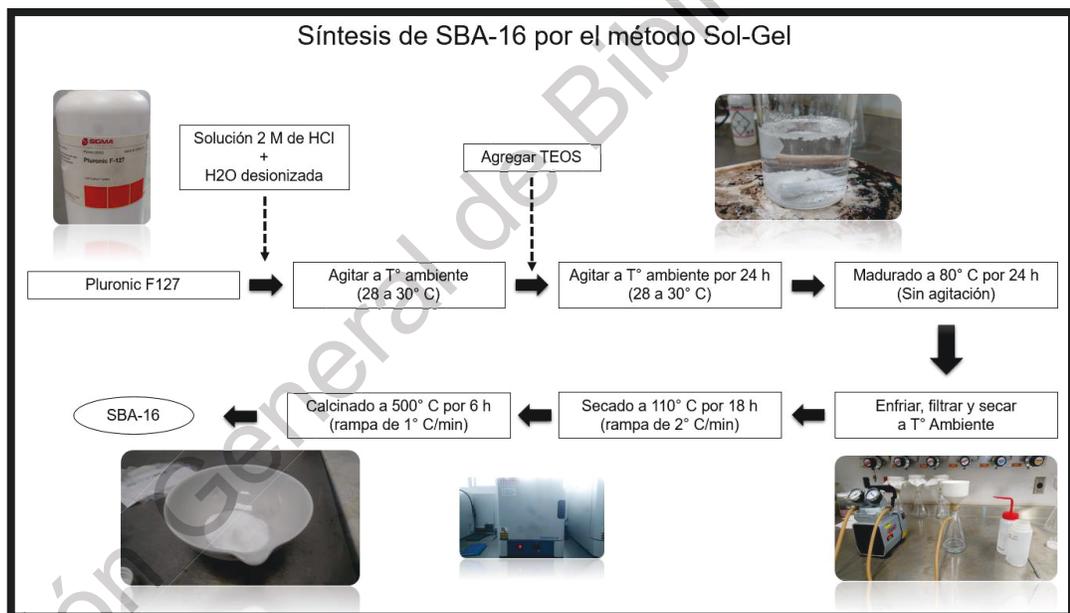


Figura 4.2 Proceso de síntesis de la sílice mesoporosa SBA-16.

Para la obtención de la SBA-16, el procedimiento fue similar al utilizado para la SBA-15, siguiendo la ruta Sol-Gel modificada (Zhao *et al.*, 1998; Flodström y Alfredsson, 2003). Utilizando el surfactante neutro “F127” para dirigir la mesoestructura cúbica, disolviéndolo en una solución de agua desionizada con ácido clorhídrico 2 M, con agitación constante a temperatura (T°) ambiente (30° C)

por una hora. Se añadió el TEOS, como precursor de la sílice y se mantuvo la reacción por 24 h a T° ambiente con agitación constante. Se maduró el material y secó, de la misma manera que la SBA-15. Al final, se calcinó a 500° C por 6 h, con una rampa de T° de 1° C/min (Figura 4.2).

Caracterización de materiales

Una vez sintetizados los materiales de sílice mesoporosa de tipo SBA-15 y SBA-16, se pesaron y almacenaron en frascos de cristal. Posteriormente fueron caracterizados para definir sus rasgos. Para ello se enviaron muestras a un laboratorio y por medio de la técnica de adsorción utilizando la isoterma BET con nitrógeno, se obtuvo la medida de su porosidad (diámetro y volumen de poro) y área superficial. Se enviaron muestras para observar con microscopía electrónica de transmisión (TEM) la morfología y tamaño de los materiales.

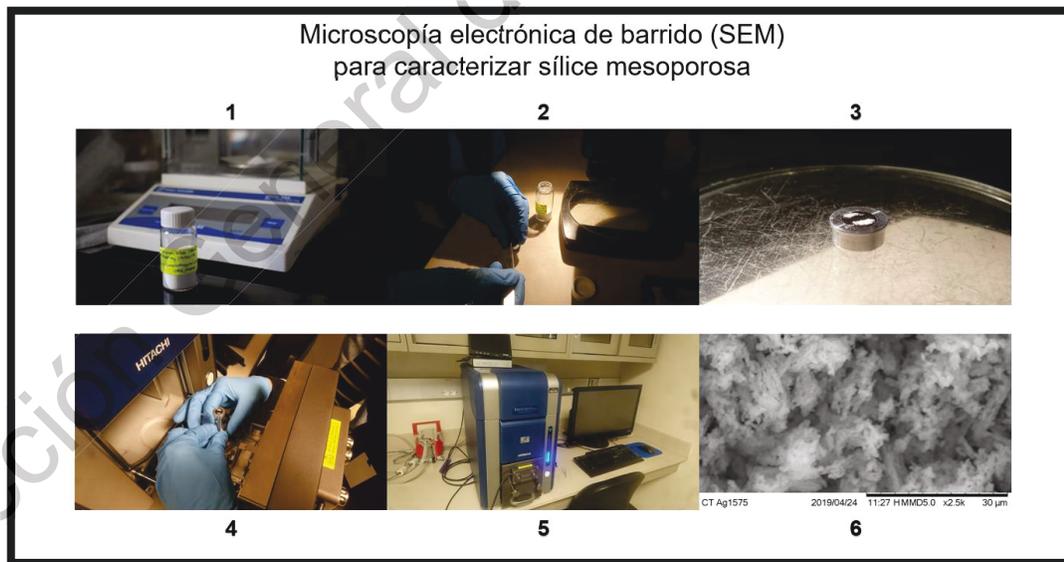


Figura 4.3 Procedimiento de preparación de muestras para observación de materiales mesoporosos por medio de la microscopía electrónica de barrido (SEM). 1, pesar materiales; 2, fijar materiales; 3, ajustar muestra en microscopio óptico; 4, introducir muestra al SEM; 5, generar vacío; 6, observar.

Durante la estancia realizada en The Connecticut Agricultural Experiment Station (Connecticut, USA), se observaron muestras de los materiales mesoporosos con microscopía electrónica de barrido (SEM) en el Tabletop Microscope “TM3030Plus” Hitachi, para analizar los materiales en seco una vez almacenados (Figura 4.3). De igual manera se prepararon suspensiones de ambos materiales sonificados durante 2 minutos, en agua desionizada a 200 ppm, para analizar con la técnica de difracción dinámica de la luz (DLS) el potencial ζ y medir la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (carga) de las partículas de los materiales.

Evaluación de germinación de semillas y crecimiento de plántulas

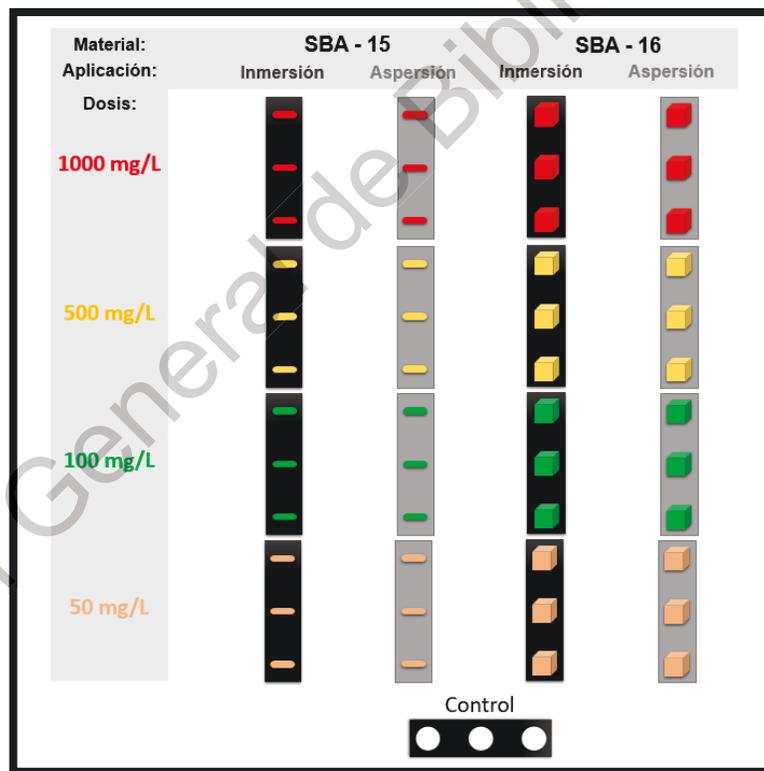


Figura 4.4 Diseño experimental para probar el efecto de la sílice mesoporosa en la germinación de semillas de chile jalapeño.

Para evaluar el efecto de la sílice mesoporosa, se planteó inicialmente un experimento de germinación que consistió en un diseño factorial (3 factores) con 3 réplicas y 15 semillas por réplica. Los factores a considerar para establecer los tratamientos, fueron el tipo de material de sílice mesoporosa (SBA-15 o SBA-16), el tipo de aplicación (por medio de inmersión previa en una suspensión o por aspersión periódica sobre las semillas) y la dosis utilizada (50 mg/L, 100 mg/L, 500 mg/L y 1,000 mg/L). Cada tratamiento comparado con un control, que sólo se trató con agua desionizada.

Condiciones experimentales

El experimento se llevó a cabo en septiembre de 2018, en el laboratorio de fisiología vegetal (Figura 4.5), al interior del campus Amazcala ($20^{\circ}42'19.6''N$, $100^{\circ}15'35.8''O$) de la Universidad Autónoma de Querétaro, a una altura de 1920 msnm en el municipio de El Marqués, Querétaro, México. El experimento se montó al interior del laboratorio, sobre mesas de acero inoxidable, donde la temperatura oscilaba entre los 23° y 28° C, mientras la humedad relativa (HR) se encontró alrededor del 17% durante los 14 días que duró el experimento, con iluminación natural indirecta.

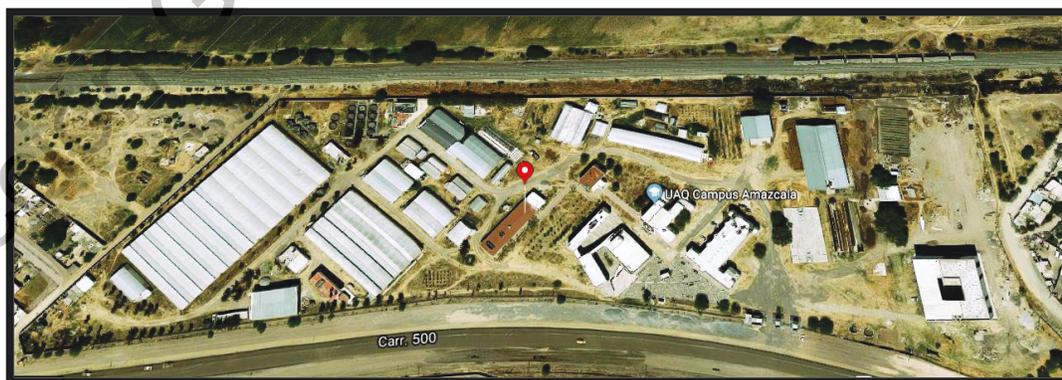


Figura 4.5 Vista aérea del campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, señalando el laboratorio de fisiología vegetal (Google, 2019)

Material biológico

Para el experimento se utilizó semilla Harris Moran (Figura 4.6), variedad Jalapeño Dante (HMX 4664 F1), debido a su precocidad y resistencia a enfermedades como la mancha bacteriana y el mosaico del tabaco (Harris Moran, 2015).

HMX 4664 F1

Jalapeños de calidad con tamaños extra grandes



CARACTERÍSTICAS

- FRUTOS DE EXCEPCIONAL TAMAÑO
- FRUTOS LISOS, ATRACTIVO COLOR VERDE BRILLANTE
- PLANTA DE ALTOS RENDIMIENTOS CON SET CONCENTRADO CONTINUO

Madurez relativa	Tipo	Estructura de planta	Tamaño del fruto	Color de fruto
Precoz	Jalapeño	Vigorosa, Semi-abierta	XL-J	Verde brillante

(HR=ALTA RESISTENCIA, IR = RESISTENCIA INTERMEDIA)

HR/IR	Nombre Común	Abreviación	Patógeno
HR	Mancha bacteriana	Xcv 1,2,3	Xanthomonas campestris pv. vesicatoria raza 1,2,3
HR	Mosaico del tabaco	TMV	Virus del mosaico del tabaco

Figura 4.6 Características de la semilla de chile jalapeño Dante (Harris Moran, 2015).

Preparación de materiales y aplicación de tratamientos

Los materiales de sílice mesoporosa se pesaron y suspendieron en agua desionizada, de acuerdo a las dosis establecidas. Luego se sonicaron las suspensiones por un par de minutos con intervalo de un minuto, utilizando un sonotrodo homogeneizador ultrasónico portátil Hielscher UP200Ht. Una vez

sonicadas las suspensiones, se guardaron en frascos ámbar de 250 mL, hasta su utilización (Figura 4.7).



Figura 4.7 Preparación del experimento de germinación. 1) Reunir materiales 2) sonicar material 3) colocar papel filtro dentro de cajas Petri y 4) colocar semillas.

Una vez listos los materiales, se procedió a aplicar cada tratamiento, para lo cual se comenzó con las semillas tratadas por inmersión. En vasos precipitados de 250 mL, se vertieron 50 mL de suspensión con cada tipo de material mesoporoso y cada dosis establecida. Se agregaron 50 semillas por recipiente, considerando que se necesitaron 45 (15 por 3 repeticiones) y se agitaron suavemente, dejando reposar las semillas dentro de la suspensión por una hora. Al finalizar la inmersión, se colocan las semillas sobre papel de laboratorio (sanitas), para drenar el exceso de humedad.

A continuación, las semillas de todos los tratamientos se colocaron en cajas Petri de plástico nuevas (100 x 25 mm), sobre hojas de papel filtro humedecido, las

cuales sirvieron para conservar agua y brindaron soporte a las semillas. Distribuidas en formación "6 x 5", las semillas se situaron al centro de la caja Petri, similar a lo realizado en otros experimentos de germinación (Torney *et al.*, 2007; Ayala-Villegas *et al.*, 2014).

Posteriormente, las semillas que correspondían a los tratamientos de aspersión, fueron rociadas con las suspensiones de sílice mesoporosa, aplicando con jeringa 5 mL a cada caja de Petri. Luego se colocaron las tapas a todas las semillas, para mantener la humedad.



Figura 4.8 Plántulas de chile jalapeño germinadas en caja de Petri sobre papel filtro.

A partir de ese momento comenzó a contar el tiempo del experimento, y durante los días posteriores, cada que las semillas mostraban resequead en el papel filtro, eran rociadas con 5 mL de agua desionizada o suspensión de sílice mesoporosa, de acuerdo al tratamiento correspondiente. En el momento en que las plántulas germinadas tocaron con la tapa de las cajas de Petri, se dejaron de tapar (Figura 4.8), aumentando la cantidad y frecuencia con la que se realizaba el riego (llegando a ser de hasta 10 mL diarios).

Variables evaluadas

Se realizó un conteo diario de la germinación, considerando como semilla germinada, la que presentaba una radícula de al menos 4 veces la longitud de la semilla. El día 14, se procedió a registrar en fotografías las diferencias visibles y colocando las plántulas extendidas sobre un fondo graduado, se midió la longitud total de la plántula y la longitud de la raíz (ISTA, 2015; Alberta Government, 2016). Luego de las mediciones, las plántulas fueron protegidas con papel aluminio, se introdujeron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . Para posteriormente realizar pruebas moleculares para fenoles y flavonoides, actividad antioxidante y acuaporinas, a través de la expresión de los genes PAL, CHS, POD, MnSOD y CaPIP1-1.

Análisis estadístico

Se llevaron a cabo análisis de varianza (ANOVA) de una vía y pruebas comparativas de Dunnett con al menos una $P=0.05$ de confiabilidad, para las variables de germinación, longitud de plántula y longitud de raíz. Para la evaluación la expresión genética, se utilizaron las pruebas de Dunnett y Sidak, ($P=0.01$).

Sílíce mesoporosa en el crecimiento y desarrollo del chile

Una vez que se obtuvieron resultados de los experimentos de germinación, se determinaron los tratamientos que eran convenientes trasladar a un experimento a mayor escala. De esa forma se planteó un experimento que da seguimiento al cultivo, durante todas las etapas fenológicas de las plantas de chile, desde el semillero y trasplante hasta la madurez.

El experimento utilizó un diseño factorial (3 factores) con 5 réplicas. Los factores a considerar para establecer los tratamientos fueron, el tipo de material de

sílice mesoporosa (SBA-15 o SBA-16), la frecuencia de aplicación (semanal o quincenal) y la dosis utilizada (25 mg/L, 50 mg/L y 100 mg/L). Cada tratamiento comparado con un control, que sólo se trató con agua desionizada (Figura 4.9).

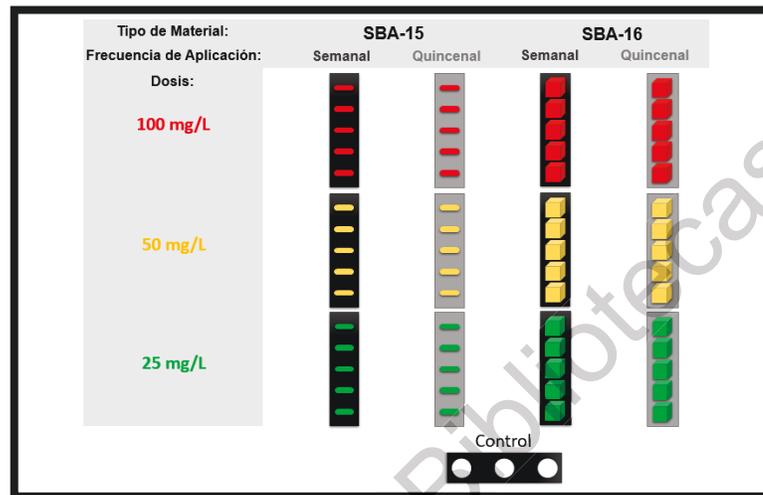


Figura 4.9 Diseño experimental para probar el efecto de la sílice mesoporosa en chile jalapeño.

Condiciones experimentales

El experimento se llevó a cabo al interior del campus Amazcala, en el invernadero de producción de plántula, en un invernadero para uso experimental y en el laboratorio de fisiología vegetal, seleccionando estas condiciones como término medio entre la producción en laboratorio y de campo, debido a que los NMs o similares, son influenciados de forma importante por el medio ambiente (Ashkavand *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017).

Durante las 9 semanas posteriores al trasplante, en el campus Amazcala de la UAQ, se mantuvieron temperaturas medias mínimas de 12° C y medias máximas de 28° C, con una media de 60% de HR. Se utilizó semilla Harris Moran de chile jalapeño Dante (HMX 4664 F1).

Los invernaderos utilizados, fueron de baja o mediana tecnología, los cuales tenían sistemas de enfriamiento (ventanas con malla antiáfidos o extractores de aire caliente), pero no contaban con calefacción (Figura 4.10).



Figura 4.10 Invernadero de uso experimental, utilizado para probar la MS en chile jalapeño.

Siembra de semilla y trasplante de plántula



Figura 4.11 Cronología de actividades y etapas fenológicas del chile jalapeño en invernadero.

El experimento inició en agosto de 2018, con la siembra de la semilla en una charola de unigel 128 cavidades lavada y desinfectada (sales cuaternarias de amonio al 2%), se utilizó el sustrato Sunshine "Mezcla No. 3" (Peat Moss canadiense, vermiculita, carbonatos para ajustar el pH, agente humectante y formulación base de fertilizantes), colocando la semilla a menos de 5 mm de profundidad y se cubrió con vermiculita, para facilitar la emergencia. Se les administró el riego según lo requerido.

Trascurridas 10 semanas, y con dos pares de hojas verdaderas, las plántulas fueron trasplantadas a bolsas en octubre, con una mezcla de suelo a base de tezontle, composta Bokashi y tierra de hormiga en proporción 1:1:1. Se instaló un riego por goteo automatizado, auxiliado de riegos con manguera a medida que fue necesario (Figura 4.11).

Preparación de materiales y aplicación de tratamientos

La sílice mesoporosa, se suspendió en agua desionizada para formar tratamientos de acuerdo a las dosis establecidas. Se sonicaron de la misma forma que los materiales utilizados en el experimento de germinación. Las suspensiones se almacenaron en frascos ámbar de 250 mL y se preparaba más suspensión conforme se necesitaba.

Los tratamientos fueron aplicados a partir del trasplante de acuerdo a las dosis establecidas. Las soluciones se aplicaron con un bote atomizador de 250 mL, de manera semanal o quincenal (de acuerdo al tratamiento). Para aplicar la aspersion se usó como medida el punto de goteo (cantidad de humedad suficiente para formar gotas en el área foliar de la planta), con un límite máximo de 50 mL de suspensión aplicada por planta. Cuando coincidió el riego y la aplicación de los tratamientos, se asperjó después del riego.

Variables evaluadas

Durante la primera y sexta semana, se realizó un monitoreo del crecimiento de las plantas, para observar posibles tendencias. En la novena semana se dio como finalizado el experimento en condiciones normales, para que los resultados no se vieran afectados por las bajas temperaturas de invierno.

Para la evaluación final del experimento se midieron algunas variables morfológicas propuestas por IPGRI *et al.* (1995) en su documento “descriptores de *Capsicum* (*Capsicum spp.*)”. Se registraron los datos de altura de la planta (medida con un flexómetro desde el cuello del tallo al ápice), la altura de tallo (medida con un flexómetro desde el cuello del tallo a la primer bifurcación), grosor de tallo (diámetro medido con un vernier a la mitad de la altura del tallo), cantidad de hojas (contadas todas las hojas verdaderas), tamaño de hojas (medidas con una regla el lado más largo y ancho de 3 de las hojas sanas más cercanas a la primer bifurcación), floración (contado el total de primordios florales) y fructificación (contado el total de frutos cuajados) en el laboratorio de fisiología vegetal del campus Amazcala.

Una vez realizadas la mediciones, se colectaron muestras de hojas sanas y se guardaron en papel aluminio, luego se introdujeron en nitrógeno líquido para detener su deterioro y se almacenaron a -80° C. Posteriormente a las muestras se le realizaron análisis de metabolitos especializados y pruebas moleculares para fenoles, flavonoides y actividad antioxidante, a través de la expresión de los genes PAL, CHS, POD y MnSOD.

Análisis estadístico

Al igual que en el experimento de germinación, se llevaron a cabo análisis de varianza (ANOVA) de una vía y pruebas comparativas de Dunnett con al menos una $P=0.05$ de confiabilidad, para las variables morfológicas, análisis de metabolitos especializados y pruebas moleculares de expresión genética.

Pruebas moleculares y metabolismo especializado

Pruebas moleculares (PAL, CHS, POD, MnSOD y CaPIP1-1)

Con las muestras congeladas del experimento de germinación y las hojas del experimento en invernadero, se realizaron pruebas moleculares para evaluar el estrés abiótico en las plantas. Se utilizó la cuantificación de la expresión genética por PCR en tiempo real o “RT-qPCR” (Wu *et al.*, 2007).

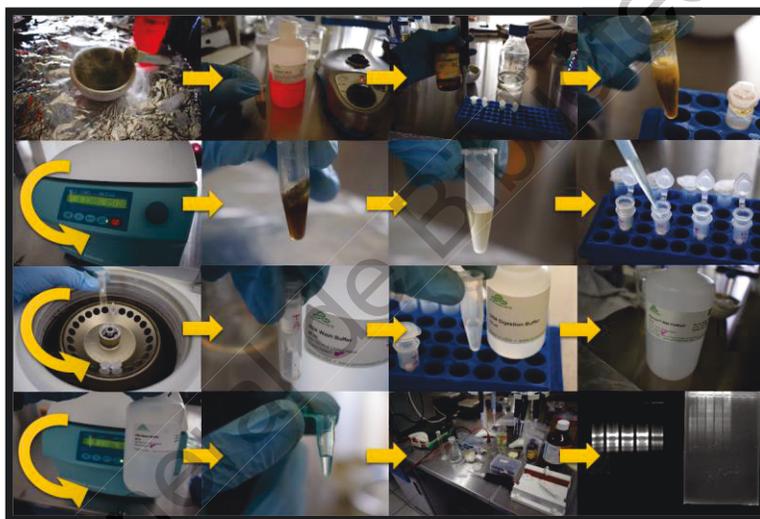


Figura 4.12 Procedimiento para la extracción de ARN de tejidos de chile.

Basados en estudios anteriores, se eligieron dos marcadores moleculares para observar el comportamiento de la síntesis de fenoles, uno de ellos es la Fenilalanina Amoniac Liasa (PAL, GenBank AF081215), y flavonoides con Chalcona Sintasa (CHS, GenBank FJ705842.1). Para probar la expresión oxidativa se utilizaron la Superóxido Dismutasa de Manganeso Mitocondrial (MnSOD, GenBank AF036936.2) y la Peroxidasa (POD, GenBank FJ596178.1) como referentes (Rodríguez-Calzada *et al.*, 2019). Se analizaron las proteínas intrínsecas de la membrana plasmática por medio del marcador molecular CaPIP1-1 (GenBank

JX402929, para *Capsicum annuum* L.), añadiendo la beta-tubulina (β -TUB, GenBank EF495259.1) como gen constitutivo o “housekeeping” (Yin *et al.*, 2015).

Para realizar las pruebas moleculares, se necesitó ADN complementario y para obtenerlo se debió realizar primero la extracción de ARN, para lo que se utilizó el método Trizol y para la purificación el RNA Kit Zymo Research Direct Zol RNA Miniprep. Iniciando con la pulverización de 100 mg de tejido vegetal en un mortero con nitrógeno líquido, se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se añadieron 600 μ L de Tri Reagent (en lugar de Trizol) y se homogenizaron mediante vortex, se incubó a T° ambiente por 5 min. Se agregaron 200 μ L de cloroformo y agitó vigorosamente por 15 s. Se incubó a T° ambiente por 3 min. Se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4° C. Se transfirió la fase incolora a un nuevo tubo Eppendorf y se adicionó un volumen igual de etanol 95%. Se mezcló por pipeteo y se transfirió la mezcla a la columna del Kit Zymo-Spin IIC Column. Se colocó dentro de un tubo colector y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Se descartó el filtrado y se añadieron 400 μ L de RNA Wash Buffer del Kit, dentro de la columna y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. En un tubo libre de RNasa (Tubo Eppendorf o tubo para PCR), se preparó la siguiente mezcla 5 μ L de DNasa I, 75 μ L de DNA Digestion Buffer y se mezcló por pipeteo. Hecha la mezcla se adicionó directamente a la matriz de la columna. Se incubó a T° ambiente por 15 min. Se adicionaron 400 μ L de Direct-zol RNA PreWash a la columna y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Descartando el filtrado y repitiendo el paso. Se adicionaron 700 μ L de RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó por 2 min a 13,000 rpm para asegurar la completa remoción del buffer de lavado. Se transfirió cuidadosamente dentro de un tubo libre de RNasa. Para eluir el RNA obtenido, se añadieron 50 μ L de agua libre de DNasa/RNasa (agua de ampolleta) directamente a la matriz de la columna y se centrifugó. Se almacenó a -70°C. Para verificar la calidad del RNA extraído, se corrieron las muestras en un gel de agarosa desnaturalizante al 1.2% y se visualizaron en el fotodocumentador. Finalmente se cuantificó por espectrofotometría para conocer la concentración del RNA obtenido (Figura 4.12).

Para sintetizar el ADN complementario (cDNA) se utilizó el Kit First Strand cDNA Synthesis y el Thermo Scientific Maxima First Strand for RT-qPCR cat. #K1641 1. Se añadieron en un tubo estéril libre de RNasa (Tubo para PCR) 4 μ L de 5X Reaction Mix, 2 μ L de Maxima Enzyme Mix, 500 ng de templado de RNA y la cantidad restante de agua libre de nucleasas para ajustar a un volumen de 20 μ L. Se mezcló suavemente y en el termociclador se incubó por 10 minutos a 25° C, se mantuvo a 50° C por 15 min y se terminó la reacción calentando por 5 min a 85° C. Se sacó y se pudo almacenar a -20° C por un corto tiempo.

Una vez obtenido el cDNA de las muestras, ya se pudo comenzar a realizar el RT-qPCR. Pero antes de comenzar a realizar el procedimiento, se realizó el PCR punto final de los oligonucleótidos para conocer las condiciones adecuadas de amplificación (temperatura y número de ciclos) para cada gen (Cuadro 4.1). Las condiciones de reacción fueron: 2 s, 95 ° C y 40 ciclos de 3 s, 95 ° C y 30 s, 60 ° C.

Cuadro 4.1 Mezclas con las condiciones más apropiadas para la amplificación de los oligonucleótidos.

Mezcla más apropiadas para los oligonucleótidos							
Gen	Ciclos	T° (° C)	SYBER mix (mL)	Oligo F (mL)	Oligo R (mL)	cDNA a 100 ng/mL (mL)	H₂O (mL)
POD	21	55	5	0.15	0.15	2	2.7
PAL	20	55	5	0.15	0.3	2	2.55
CaPIP1-1	19	55	5	0.3	0.9	2	1.8
CHS	25	58	5	0.9	0.9	2	1.2
MnSOD	22	58	5	0.15	0.15	2	2.7
β -TUB	18	55	5	0.15	0.3	2	2.55

Determinación de compuestos fenólicos

La determinación de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante, se llevó a cabo en el Campus Aeropuerto de la UAQ con el apoyo de la Dra. A. Angélica Feregrino Pérez.

Las muestras utilizadas se extrajeron de tejidos congelados. Se tomó 1 g de material y se colocó en un matraz de 50 mL, al cual se le adicionaron 10 mL de metanol. Se cubrió el matraz con papel aluminio y se selló, para agitarse durante 24 h. Posteriormente se centrifugó a 5, 000 rpm por 10 min a 4 °C. Al final, se filtró el contenido del matraz con una membrana de 0.45 µm, y se guarda el sobrenadante (Cardador-Martínez *et al.*, 2002).

Para determinar los fenoles totales en las muestras, se prepara una curva de calibración, luego se tomaron 40 µL del extracto metanólico de cada muestra, se coloca en tubos, se adicionaron 460 µL de agua destilada, 250 µL de folin y 1, 250 µL de carbonato de sodio (Na₂CO₃), y se tapa para agitarse en el vortex. Posteriormente se dejaron reposar en la oscuridad por 2 h. Una vez transcurrido el tiempo, se colocan 200 µL de muestra por triplicado y se leen a 760 nm en el fotómetro para microplacas Multiskan (Dewanto *et al.*, 2002).

Determinación de flavonoides

Para obtener los flavonoides totales de una muestra, se hizo uso de una curva de calibración de rutina. Y para la determinación en las muestras, se colocaron por triplicado, 50 µL del extracto metanólico de las muestras en un tubo, se adicionaron 180 µL de agua destilada y 20 µL de solución 2-aminoetildifenil borato al 1%. Se prepara un blanco y se lee la absorbancia a 404 nm en el fotómetro para microplacas Multiskan. Finalmente se comparan las lecturas con las de la curva de calibración, y se expresan los resultados como mg equivalentes de rutina por gramo de muestra (Oomah *et al.*, 2005).

Determinación de la actividad antioxidante

Se utilizó el método con DPPH (2, 2 - difenil - 1 - picrilhidracilo), para el cual una vez preparadas las soluciones de DPPH y de Trolox, se designaron espacios en la placa donde se realizaron las pruebas por triplicado, se agregaron los blancos

(con agua para HPLC), controles (con DPPH), las soluciones metanólicas de Trolox (con DPPH) y las muestras (extracto metanólico y DPPH). Finalmente se leyó la placa a 520 nm en el fotómetro para microplacas Multiskan (Fukumoto y Mazza, 2000).

De igual manera la determinación de la actividad antioxidante se realizó por el método con ABTS, el cual fue preparado con 12 h de anticipación en una solución de Persulfato de Potasio ($K_2S_2O_8$) guardado en la oscuridad para generar el radical. Luego se preparó una dilución con etanol, la cual leída en el fotómetro a 734 nm debía tener una absorbancia entre 0.7 y 1. Posteriormente se preparó una solución estándar de Trolox, y las soluciones de su respectiva curva de calibración. Una vez listos los reactivos, se prepara la placa de 96 pozos por triplicados para blancos, controles y muestras (metanólicas y acuosas). Al final se leyó la placa a 734 nm en el fotómetro para microplacas Multiskan (Re *et al.*, 1999).

Efecto de la sílice mesoporosa ante un factor de estrés abiótico

Una vez finalizadas las evaluaciones del experimento en invernadero (Amazcala, agosto a diciembre de 2018) bajo condiciones ambientales aceptables para el cultivo de chile, se decidió en base al historial climático de la región, someter el experimento a un estrés abiótico causado por bajas temperaturas. Generalmente en estas condiciones, cuando no hay un sistema de calefacción apropiado, se producen importantes daños por heladas (congelación por temperaturas bajo cero), los cuales tienen efectos adversos en las plantas y en la producción obtenida.

Para evaluar el efecto de la sílice mesoporosa ante el estrés causado por el frío, se continuó el experimento con las mismas condiciones de manejo y tratamientos, durante todo el mes de enero, donde se presentaron cuatro eventos considerados como “heladas” (Figura 4.13). Durante éste tiempo, las plantas estuvieron protegidas del exterior únicamente por la membrana del invernadero, sin sistemas de calefacción. Al final se evaluó la producción, los niveles de clorofila y el metabolismo especializado en frutos cosechados.

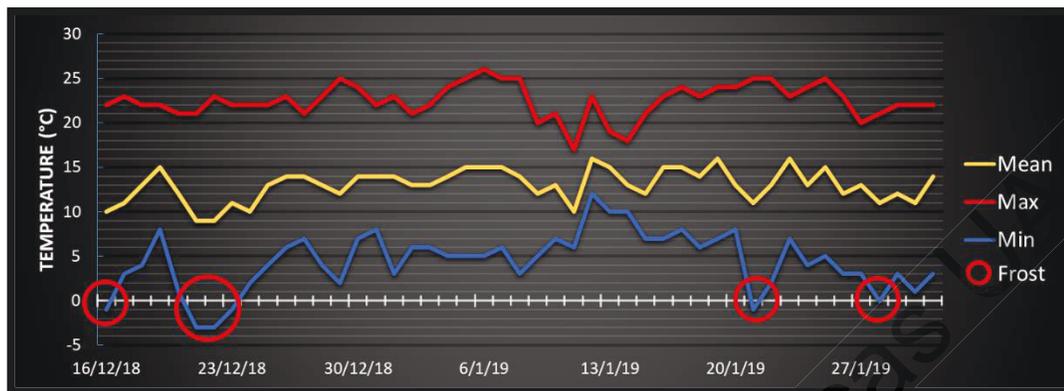


Figura 4.13 Condiciones térmicas durante enero de 2019 en Amazcala, El Marqués, Qro. Temperaturas promedio (amarillo), máximas (rojo) y mínimas (azul). Se muestran señalados en círculos rojos, los cuatro eventos con condiciones denominadas como “heladas” (temperaturas bajo cero). Estación meteorológica “Aeropuerto Intercontinental de Querétaro (MMQT)”, 2019.

Prueba de fitotoxicidad (estancia de investigación)

En la búsqueda por tener una visión más amplia del efecto de la sílice mesoporosa en las plantas de chile, se planteó un experimento para ayudar a definir los límites en los que las aplicaciones se vuelven tóxicas para las plantas o si el rango de seguridad era mayor, que el probado en los probados anteriormente. Para ello, se diseñó un experimento factorial con 5 réplicas, considerando tres factores, el tipo de sílice con dos morfologías distintas (SBA-15 y SBA-16), el tipo de aplicación (riego y “dipping/aspersión”) y las dosificación (100 mg/L, 1,000 mg/L y 2, 000 mg/L), más un control. Este último factor, basado en las dosis más altas probadas los experimentos anteriores y una dosis aún más alta, pero dentro de lo reportado por la literatura (Figura 4.14).

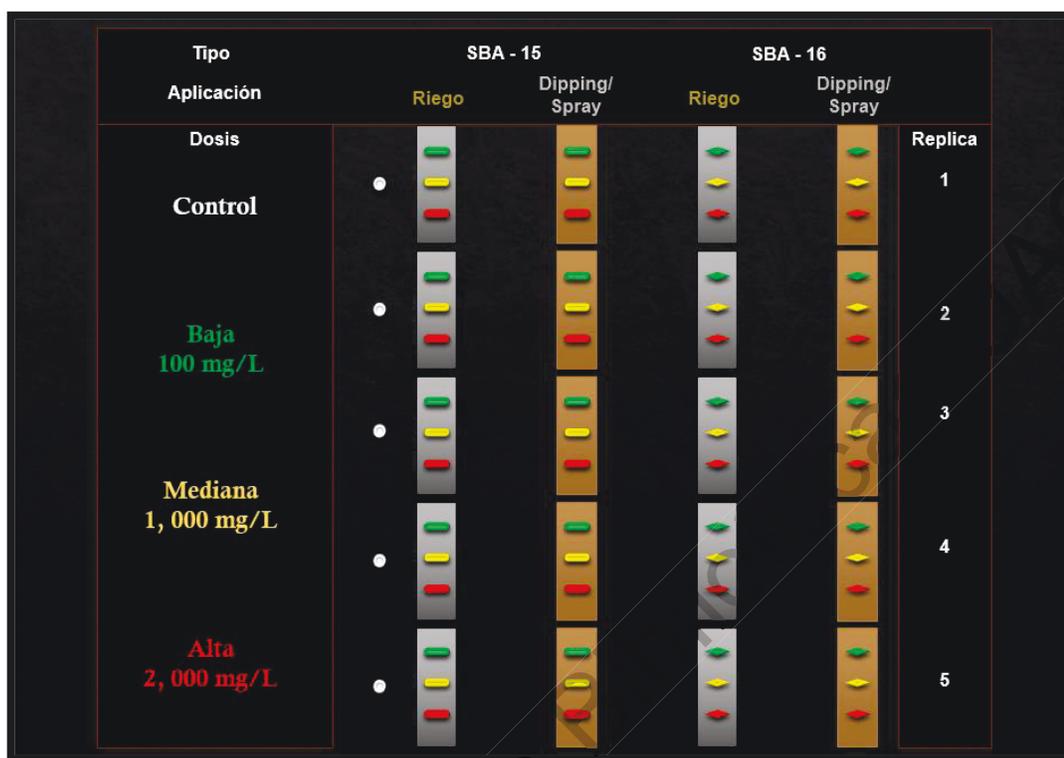


Figura 4.14 Diseño experimental para probar el efecto de la sílice mesoporosa en altas concentraciones sobre chile jalapeño.

Condiciones experimentales

El experimento se llevó a cabo durante una estancia de investigación en The Connecticut Agricultural Experiment Station en la ciudad de New Haven, Connecticut, con apoyo del Departamento de Química Analítica, bajo la dirección del Dr. Jason C. White, quienes ya tienen experiencia con estudios de fitotoxicidad por nanomateriales.

La experimentación se llevó a cabo en los meses de enero a mayo, en un invernadero para uso experimental de mediana tecnología con calefacción y ventilación automatizada, así como iluminación diurna artificial para auxiliar a las plantas con radiación durante el invierno. El manejo fue similar al realizado en México, con riego y fertilización según era requerido. Se utilizó semilla de chile

jalapeño Dante F1 de Harris Moran. Logrando temperaturas interiores mínimas de 16 °C, promedio de 24 °C y máximas de hasta 38 °C (abril/mayo).

Siembra de semilla y trasplante de plántula

La siembra de las semillas comenzó el 14 de enero de 2019, utilizando almácigos de plástico sobre bandejas para mantener la humedad drenada. Una vez que las plantas en el invernadero desarrollaron hojas verdaderas, el trasplante en macetas se realizó el 22 de febrero de 2019. Como sustrato, tanto para la germinación como para el trasplante, se utilizó una mezcla comercial de sustrato PRO-MIX® BX, auxiliando la nutrición con fertilizante según lo requerido (Miracle-Gro®).

Preparación de materiales y aplicación de tratamientos

La sílice mesoporosa se preparó en un medio acuoso con agua desionizada, y se realizó la sonicación de la suspensión con las mismas condiciones que las utilizadas en México. Se prepararon las suspensiones con las concentraciones correspondientes para cada tratamiento y se aplicaron al momento de hacer el trasplante.

Para los tratamientos con aplicación por riego, se vertieron por única ocasión 125 mL de suspensión con sílice mesoporosa por tratamiento (25 mL por planta/réplica), alrededor del tallo de las plántulas bajo la cobertura del área foliar, una vez trasplantadas del almácigo a las macetas.

En el caso de los tratamientos con aplicación por dipping y aspersion, se comenzó preparando 100 mL de suspensión en un vaso con las concentraciones de cada tratamiento. Al momento de sacar las plántulas del almácigo, se sostuvo firmemente el sustrato y se voltearon, para sumergir la parte aérea de las plántulas dentro del vaso con cada una de las respectivas suspensiones (dipping). Luego de 10 segundos dentro de las suspensiones, luego se sacaron y escurrieron por un

momento, para finalizar el trasplante a las macetas. Posteriormente, se prepararon botes atomizadores con cada una de las suspensiones, y se aplicaban semanalmente a toda el área foliar (aspersión) utilizando como medida el punto de goteo (cantidad de humedad suficiente para formar gotas), con un límite máximo de 25 mL de suspensión por aplicación en cada planta (Figura 4.15).



Figura 4.15 Preparación de plántulas y aplicación de tratamientos para el experimento de fitotoxicidad.

Variables evaluadas

El experimento finalizó una vez transcurridas 10 semanas posteriores al trasplante, en ese momento se midieron variables morfológicas, niveles de clorofila y se realizó un análisis elemental cuantitativo. Registrando la altura de la planta (medida con un flexómetro desde el cuello del tallo al ápice), el grosor de tallo (diámetro medido con un vernier a la mitad de la altura del tallo), la cantidad de hojas (contadas todas las hojas verdaderas), el área foliar relativa medida por análisis de imágenes con una referencia visual a través de la aplicación Easy Leaf Area (Easlon

y Bloom, 2014), los niveles de clorofila total (con un lector de clorofila MultispeQ y la aplicación PhotosynQ), el peso fresco, seco y cantidad de agua (pesando los tejidos frescos, posteriormente secándolos en un horno de aire forzado a 60 °C por 48 h y luego se calculó el porcentaje de agua perdida en la deshidratación) y finalmente la floración (contado el total de primordios florales).

Una vez finalizadas estas mediciones, se tomaron 200 mg de muestra de tejidos de raíz y de la parte aérea, con cinco replicas. La digestión de las muestras se realizó en 4 mL de ácido nítrico (HNO₃ al 65%) durante 45 minutos a 115 °C, luego se añadió 1 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂ al 30%) y se dejó por 20 minutos adicionales a 115 °C en un digestor SCP Science DigiPREP MS (SCP Science, Baie D'Urfé, Quebec, CAN). La solución resultante se diluyó a un volumen final de 50 mL para analizar con espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente con el ICP-OES ThermoScientific iCAP 6500 para los elementos P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Cu, Mo, B y Si (Pagano *et al.*, 2017).

Análisis estadístico

Se llevaron a cabo análisis de varianza (ANOVA) de una vía y pruebas comparativas de Dunnett con al menos una P=0.05 de confiabilidad, de manera similar a lo realizado en los experimentos de germinación y producción en invernadero realizados en México, para variables morfológicas, niveles de clorofila y el análisis elemental por espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).

Consideraciones éticas

Para la preparación de los materiales de sílice mesoporosa (SBA-15 y SBA-16), se aplicaron rigurosamente las buenas prácticas de laboratorio y el reglamento de seguridad, implementadas en el laboratorio de síntesis de materiales, localizado en el Centro Académico Multidisciplinario, del Campus Aeropuerto, de la

Universidad Autónoma de Querétaro. Constando de un apropiado equipo de seguridad personal, como lo es una bata de laboratorio, guantes, mascarilla y lentes de seguridad, así como el uso de campanas de extracción. Bajo el entrenamiento y supervisión de una persona capacitada y con experiencia en el manejo de los materiales en el laboratorio.

Respetando el reglamento vigente de las instalaciones y apoyados en todo momento de las Buenas Prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica (2012), de la Entidad Mexicana de Acreditación A.C. y su Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio, así como de otros manuales de instituciones oficiales que aporten estrategias de seguridad para preservar el bienestar tanto del investigador y terceros, como del medio ambiente.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los experimentos realizados bajo las condiciones anteriormente descritas, tuvieron como resultado lo siguiente.

Síntesis y caracterización de sílice mesoporosa

El material nanoestructurado con dos morfologías distintas, fue sintetizado exitosamente. La sílice de tipo Santa Barbara Amorphous estructurada por poros cilíndricos paralelos en arreglo hexagonal (SBA-15) con apariencia similar al talco y la estructurada por poros esféricos con arreglo cúbico (SBA-16) con similitud a la sal de mesa, se obtuvieron con las características típicas de este tipo de materiales al final y durante todo el proceso de síntesis (Figura 5.1), según lo reportado para la síntesis por el método Sol-Gel (Zhao *et al.*, 1998; Flodström y Alfredsson, 2003).



Figura 5.1 Apariencia de los materiales nanoestructurados, tras la calcinación de la sílice mesoporosa al final del procedimiento de síntesis por el método Sol-Gel en el Campus Aeropuerto de la UAQ. Donde se muestran la a) Santa Barbara Amorphous 15 con poros en arreglo hexagonal y b) Santa Barbara Amorphous 16 con poros en disposición cúbica.

La caracterización estructural de los materiales (Figura 5.2), mostró en cuanto a porosidad, que la SBA-15 mostraba un área superficial, volumen y diámetro de poro regular, en comparación a otros materiales SBA-15 reportados (Zhao *et al.*, 1998). En cambio en la caracterización de la SBA-16, se observó que contaba con un menor diámetro de poro, a la vez que presentaba un mayor volumen de poros y una elevada área superficial, al compararse con otras SBA-16 reportadas, y materiales similares sintetizados con el mismo surfactante (Pluronic F127), como las nanoesferas de sílice mesoporosa (Sing, 1985; Hwang *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2013).

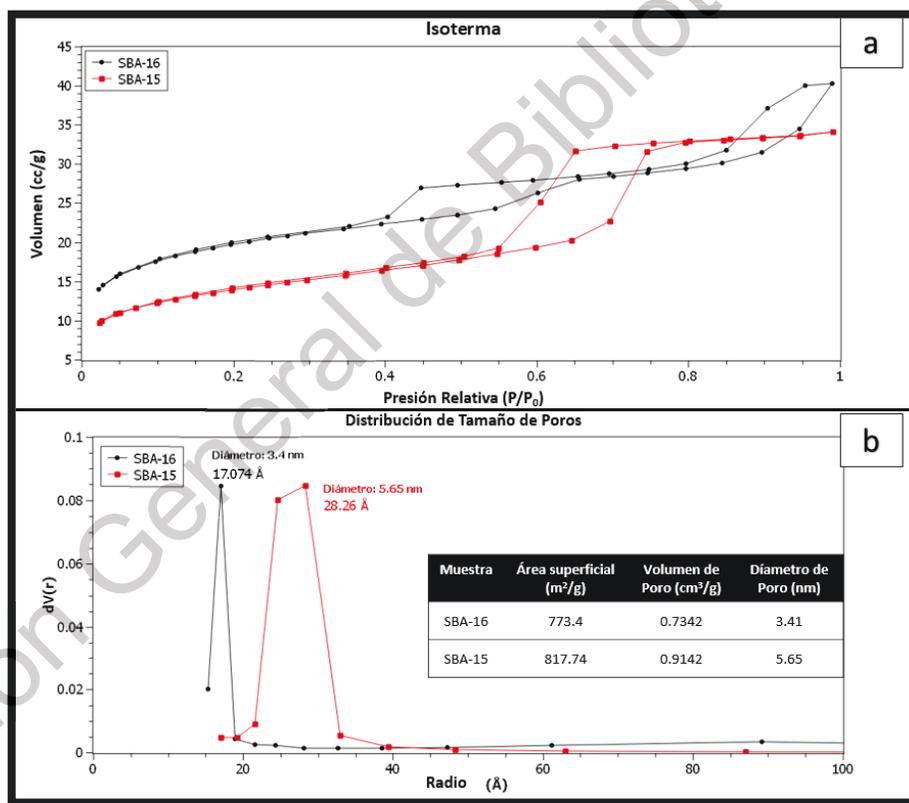


Figura 5.2 Resultados de la caracterización estructural de los materiales SBA-15 y SBA-16. Se muestran las a) isothermas BET obtenidas, con los ciclos de histéresis asociados a ambas morfologías (cilíndrica y esférica, respectivamente) y la b) distribución de la porosidad de los materiales (radio de poro). Datos con los que es posible calcular el área superficial, volumen y diámetro de poro.

La caracterización del potencial eléctrico (potencial ζ) de las partículas de sílice mesoporosa, mostró que ambos materiales tenían una carga electrostática negativa (Figura 5.3). Destacando la SBA-16 por su elevada repulsión electrostática entre partículas, en comparación con la SBA-15 sintetizada. Lo que le permite a la SBA-16 mantener una mayor dispersión al formarse suspensiones acuosas, mostrando un potencial ζ similar a lo reportado en nanopartículas de SBA-16 (Andrade *et al.*, 2013).

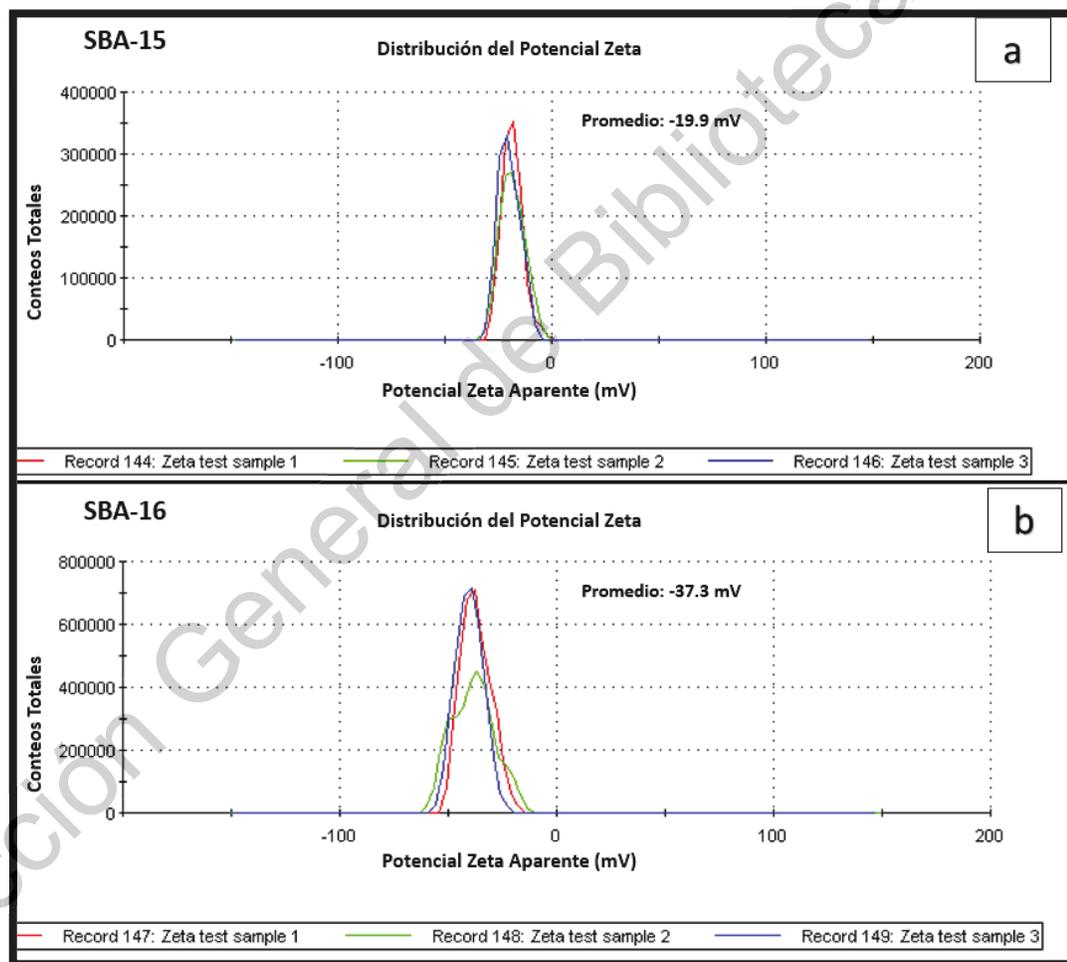


Figura 5.3 Resultados de la caracterización eléctrica de suspensiones acuosas con sílice mesoporosa. En ellos se observa la distribución del potencial zeta (ζ) de suspensiones de a) SBA-15 con carga negativa y de b) SBA-16 con una carga negativa mayor a SBA-15.

Además de las caracterizaciones fisicoquímicas realizadas, se llevaron a cabo observaciones por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM) de ambos materiales. Con las imágenes de las SBA-15 capturadas por TEM, se confirmó visualmente la existencia de partículas amorfas con estructura mesoporosa en conformación hexagonal altamente ordenada (Figura 5.4). Con las imágenes, se pudo estimar el tamaño aproximado de las partículas individuales de SBA-15, que van de los 400 a los 800 nm (basado en la escala métrica), dimensiones que son menores a las SBA-15 reportadas (Katiyar *et al.*, 2006).

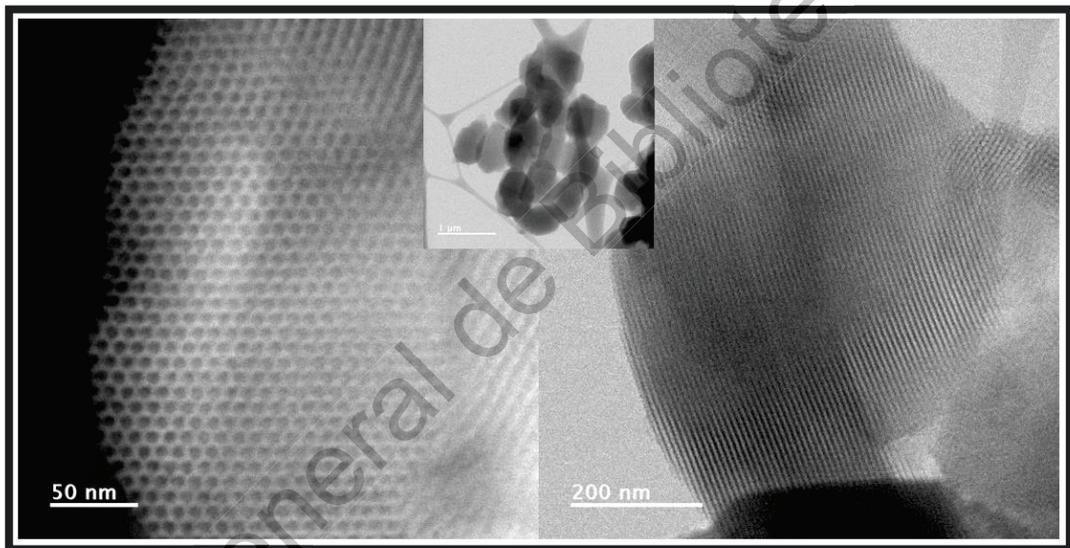


Figura 5.4 Observación de SBA-15 con poros en arreglo hexagonal altamente ordenados, a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM).

De igual manera se utilizó TEM para visualizar la SBA-16, con la cual se pudo observar un material amorfo menos ordenado que la SBA-15, lo que podría confirmar la repulsión electrostática entre partículas, sugerida por el potencial ζ de este material. A expensas de realizar una caracterización más precisa, que muestre de forma más clara el tamaño de las partículas, las imágenes sugieren que se podría tratar de nanopartículas de sílice mesoporoso, con dimensiones exteriores menores a los 100 nm (Figura 5.5).

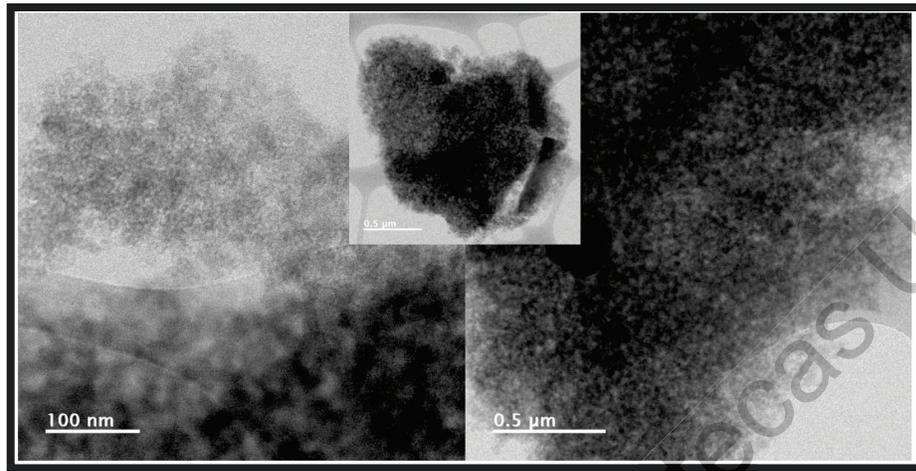


Figura 5.5 Observación de SBA-16 con poros esféricos en arreglo cúbico, a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM).

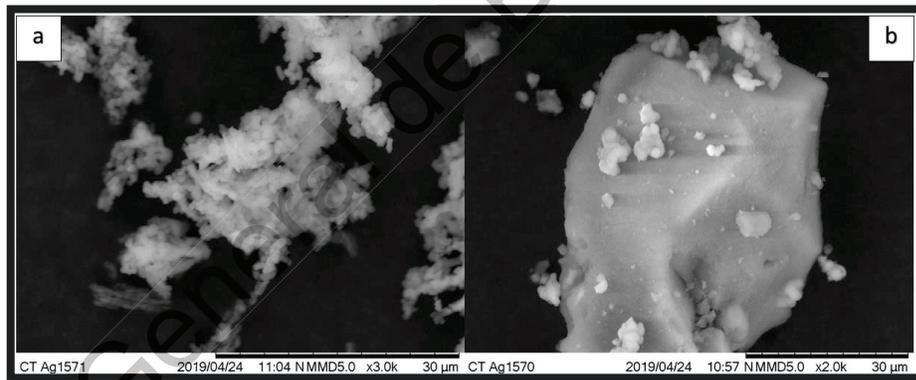


Figura 5.6 Muestras en seco de aglomeraciones de sílice mesoporosa de tipo a) SBA-15 y b) SBA-16, vistas con microscopía electrónica de barrido (SEM).

Adicional a las imágenes capturadas por medio de TEM, se realizaron observaciones de la sílice mesoporosa por medio de SEM, donde los polvos fueron observados en seco, para entender su comportamiento antes y después de preparar las suspensiones sonicadas para los tratamientos. Estas imágenes mostraron que la SBA-15 mantiene con mayor integridad la estructura de sus partículas, ya que existe mayor heterogeneidad al observar sus partículas tanto en seco (aglomerada)

como disueltas en una suspensión acuosa (simple vista). En cambio, a pesar de que la SBA-16 en seco pareciera formar partículas más grandes y sólidas, al momento de formar suspensiones acuosas, éstas se dispersan con mayor facilidad (aún antes de sonicarse) y por mayor tiempo, con más homogeneidad y tardando más tiempo en sedimentarse (Figura 5.6).

Evaluación de germinación de semillas y crecimiento de plántulas

Los primeros resultados fueron obtenidos en el experimento que evaluó el efecto de la sílice mesoporosa en la germinación de semillas. Donde el porcentaje de germinación no fue afectado de forma negativa (tóxico) ni positiva (bioestimulante) por los tratamientos comparados con un control (Cuadro 5.1 y 5.2), lo cual refleja biocompatibilidad (capacidad de un material para desempeñarse con una respuesta adecuada del hospedero en una situación específica) en las semillas (Williams, 2008). Similar a lo reportado en plantas de lupino, maíz y trigo con aplicaciones de nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN) similares a las SBA utilizadas (Hussain *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014).

Al transcurrir 14 días desde de la siembra, la longitud de plántulas y raíces mostraron respuestas con diferencias estadísticas, donde las semillas que fueron remojadas antes de la siembra, mostraron un efecto significativo sólo en las semillas sumergidas en la solución con la concentración más baja (50 mg/L) de SBA-15, las cuales presentaron un menor crecimiento que el control (efecto fitotóxico). En cambio, la mayoría de los tratamientos con aplicación periódica por aspersión, promovieron el crecimiento de las plántulas (efecto bioestimulante) de forma altamente significativa.

En el caso de la SBA-15, el crecimiento de la plántula fue en aumento a medida que lo hacía la concentración de los tratamientos (a manera de una curva hormética inversa), similar a lo observado con nanopartículas de sílice sólida (Hussain *et al.*, 2013). Mientras que los tratamientos con SBA-16, mostraron efectos positivos más contundentes, donde el tratamiento con una concentración de 100

mg/L, promovió de mejor manera el crecimiento de plántula e incluso incrementó también la longitud de la raíz (Cuadro 5.1 y 5.2, Figura A.4).

Cuadro 5.1 Resultados morfológicos y genéticos en la germinación de semillas del experimento con tratamientos a base de SBA-15.

Variables Evaluadas	Tratamientos con SBA-15 ^a							
	Aplicación por Inmersión				Aplicación por Aspersión			
	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
Porcentaje de germinación	Biocompatible				Biocompatible			
Longitud de plántula	↓**	Bio	Bio	Bio	Bio	Bio	↑*	↑**
Longitud de raíz	↓**	Bio	Bio	Bio	Biocompatible			
Expresión del gen POD								
Expresión del gen PAL								
Expresión del gen CaPIP1-1	Bio	N/A	N/A	Bio	N/A	N/A	N/A	Bio
Expresión del gen CHS								
Expresión del gen MnSOD								

^a Comparados con un control. Simbología: SBA-15 indica el uso de la sílice mesoporosa "Santa Barbara Amorphous" con poros en arreglo hexagonal; D1 (50 mg/L), D2 (100 mg/L), D3 (500 mg/L) y D4 (1000 mg/L), indican las dosis utilizadas, respectivamente; Bio o Biocompatible, indica que el tratamiento no tiene un efecto ni tóxico (↓) ni bioestimulante (↑); los asteriscos indican el grado de diferencia estadística, donde * indica una $P \leq 0.05$ (significativo), ** una $P \leq 0.01$ (altamente significativo), *** una $P \leq 0.001$ (extremadamente significativo) y **** una $P \leq 0.0001$ (extremadamente significativo).; las celdas grises indican análisis realizados con muestras de plántulas enteras; N/A indica que la prueba no fue realizada para ese tratamiento. Esta evaluación fue realizada a 14 de la siembra.

Posteriormente a los tratamientos con dosis más contrastantes o con resultados morfológicos destacables, se les hizo una evaluación molecular, pero los resultados mostraron que ningún tratamiento tuvo un efecto significativo en esta etapa de crecimiento, para genes relacionados con actividad de síntesis de fenoles, flavonoides, actividad antioxidante o actividad de las acuaporinas de la membrana plasmática (PAL, CHS, POD, MnSOD y CaPIP1-1) comparados con un control (Cuadro 5.1 y 5.2). Lo cual hace a los tratamientos evaluados biocompatibles a nivel molecular, ya que durante la germinación y en los días próximos a la germinación no es activado el metabolismo especializado (indicador de la respuesta del "sistema inmune" de la planta ante un factor de estrés), comparados con otros nanomateriales (como los basados en carbono) más reactivos (Zhang *et al.*, 2015).

Al comparar el control con el mejor tratamiento de cada tipo de sílice, se vuelve evidente el efecto positivo, tanto en el crecimiento de la plántula como en la homogeneidad de los resultados (Figura 5.7).

Cuadro 5.2 Resultados morfológicos y genéticos en la germinación de semillas del experimento con tratamientos a base de SBA-16.

Variables Evaluadas	Tratamientos con SBA-16 ^a							
	Aplicación por Inmersión				Aplicación por Aspersión			
	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
Porcentaje de germinación	Biocompatible				Biocompatible			
Longitud de plántula	Biocompatible				↑***	↑****	Bio	↑****
Longitud de raíz	Biocompatible				Bio	↑*	Bio	Bio
Expresión del gen POD								
Expresión del gen PAL								
Expresión del gen CaPIP1-1	N/A	N/A	N/A	Bio	N/A	Bio	N/A	Bio
Expresión del gen CHS								
Expresión del gen MnSOD								

^a Comparados con un control. Simbología: SBA-16 indica el uso de la sílice mesoporosa "Santa Barbara Amorphous" con poros en disposición cúbica; D1 (50 mg/L), D2 (100 mg/L), D3 (500 mg/L) y D4 (1000 mg/L), indican las dosis utilizadas, respectivamente; Bio o Biocompatible, indica que el tratamiento no tiene un efecto ni tóxico (↓) ni bioestimulante (↑); los asteriscos indican el grado de diferencia estadística, donde * indica una $P \leq 0.05$ (significativo), ** una $P \leq 0.01$ (altamente significativo), *** una $P \leq 0.001$ (extremadamente significativo) y **** una $P \leq 0.0001$ (extremadamente significativo); las celdas grises indican análisis realizados con muestras de plántulas enteras; N/A indica que la prueba no fue realizada para ese tratamiento. Esta evaluación fue realizada a 14 de la siembra.

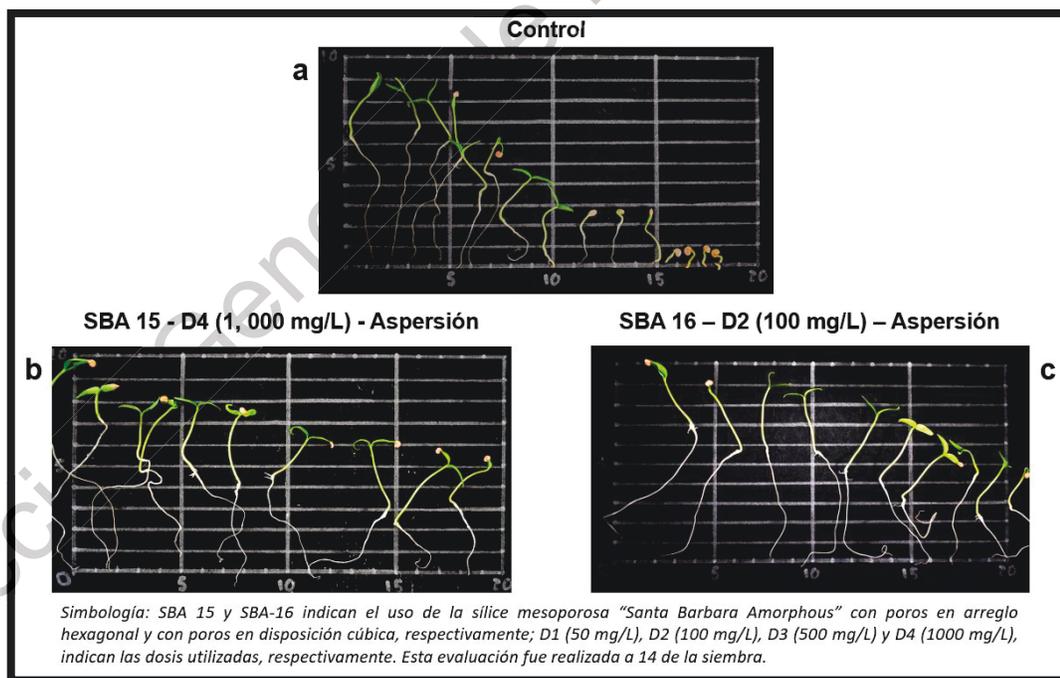


Figura 5.7 Plántulas control (a) comparadas con las plántulas del mejor tratamiento de SBA-15 (b) y de SBA-16 (c), las cuales presentan una menor diferencia de crecimiento.

Sílice mesoporosa en el crecimiento y desarrollo del chile

El segundo experimento, donde se trabajaron las plantas a lo largo de todas sus etapas fenológicas en invernadero, se mostraron resultados más complejos. De manera inicial se puede observar que hubo efectos distintos a los observados en el experimento de germinación, lo cual refleja que la respuesta de la planta ante la sílice es diferente, dependiendo de la etapa de crecimiento que se evalúe.

Cuadro 5.3 Resultados morfológicos, metabólicos y genéticos del crecimiento y desarrollo de plantas de chile con tratamientos a base de SBA-15.

Variables Evaluadas	Tratamientos con SBA-15 ^a					
	Aspersión Semanal			Aspersión Quincenal		
	B	M	A	B	M	A
Altura de planta	Biocompatible			Biocompatible		
Altura del tallo	Biocompatible			Biocompatible		
Grosor del tallo	↑*	Bio	Bio	Bio	Bio	↓*
Número de hojas	Biocompatible			Biocompatible		
Tamaño de hojas	↑***	Bio	Bio	Bio	Bio	↓**
Número de flores	Biocompatible			Biocompatible		
Frutos cuajados	Biocompatible			Biocompatible		
Fenoles totales	Bio	Bio	↑****	Bio	Bio	↑****
Flavonoides totales	Biocompatible			Biocompatible		
Act. Antioxidante (DPPH)	↑****	↑****	↓****	↓****	↓****	↑****
Act. Antioxidante (ABTS)	Biocompatible			↑***	↑****	Bio
Expresión del gen POD	N/A	↑*	N/A	N/A	N/A	↑*
Expresión del gen PAL		↑*				↑*
Expresión del gen CHS		↑*				↑*
Expresión del gen MnSOD		↑*				↑*

^a Comparados con un control. Simbología: SBA-15 indica el uso de la sílice mesoporosa "Santa Barbara Amorphous" con poros en arreglo hexagonal; B, M y A, indican las dosis baja (25 mg/L), media (50 mg/L) y alta (100 mg/L) utilizadas, respectivamente; Bio y Biocompatible, indican que el tratamiento no tiene un efecto ni tóxico (↓) ni bioestimulante (↑); los asteriscos indican el grado de diferencia estadística, donde * indica una $P \leq 0.05$ (significativo), ** una $P \leq 0.01$ (altamente significativo), *** una $P \leq 0.001$ (extremadamente significativo) y **** una $P \leq 0.0001$ (extremadamente significativo); las celdas grises indican análisis realizados en hojas; N/A indica que la prueba no fue realizada para ese tratamiento. Esta evaluación fue realizada a 9 semanas del trasplante.

Así mismo, al evaluar las variables morfológicas de las plantas, se observó que tanto la morfología de la sílice como la dosis y frecuencia de aplicación, jugaron un papel importante en el efecto que produjeron los tratamientos. Donde las aplicaciones semanales, se mantuvieron menos reactivas, mostrando algunos efectos benéficos con la dosis baja (25 mg/L) de SBA-15. En cambio los

tratamientos con aplicaciones quincenales, reaccionaron de manera desfavorable en variables mayormente vegetativas, destacando que con los tratamientos a base de SBA-15, las plantas disminuyeron su crecimiento a medida que las dosis aumentaron, mientras que en los tratamientos con SBA-16 el crecimiento mejoró con el aumento de la dosis utilizada (Cuadro 5.3 y 5.4).

Cuadro 5.4 Resultados morfológicos, metabólicos y genéticos del crecimiento y desarrollo de plantas de Chile con tratamientos a base de SBA-16.

Variables Evaluadas	Tratamientos con SBA-16 ^a					
	Aspersión Semanal			Aspersión Quincenal		
	B	M	A	B	M	A
Altura de planta	Biocompatible			↓*	Bio	Bio
Altura del tallo				↓**	Bio	Bio
Grosor del tallo				↓**	↓*	↓***
Número de hojas				↓*	Bio	Bio
Tamaño de hojas				↓****	↓****	↓****
Número de flores				↓*	Bio	↓*
Frutos cuajados				Biocompatible		
Fenoles totales				Bio	Bio	↑****
Flavonoides totales	Biocompatible			Biocompatible		
Act. Antioxidante (DPPH)	Bio	Bio	↑****	Bio	↓****	↑****
Act. Antioxidante (ABTS)	Biocompatible			Bio	↑*	Bio
Expresión del gen POD	N/A	↑*	N/A	↑*	N/A	N/A
Expresión del gen PAL		↑*		↑*		
Expresión del gen CHS		↑*		↑*		
Expresión del gen MnSOD		↑*		↑*		

^a Comparados con un control. Simbología: SBA-16 indica el uso de la sílice mesoporosa "Santa Barbara Amorphous" con poros en disposición cúbica; B, M y A, indican las dosis baja (25 mg/L), media (50 mg/L) y alta (100 mg/L) utilizadas, respectivamente; Bio y Biocompatible, indican que el tratamiento no tiene un efecto ni tóxico (↓) ni bioestimulante (↑); los asteriscos indican el grado de diferencia estadística, donde * indica una $P \leq 0.05$ (significativo), ** una $P \leq 0.01$ (altamente significativo), *** una $P \leq 0.001$ (extremadamente significativo) y **** una $P \leq 0.0001$ (extremadamente significativo); las celdas grises indican análisis realizados en hojas; N/A indica que la prueba no fue realizada para ese tratamiento. Esta evaluación fue realizada a 9 semanas del trasplante.

Al analizar los compuestos bioquímicos del metabolismo especializado y la expresión genética en muestras de hoja de las plantas, salieron a la luz resultados que ayudaron a entender el efecto que estaba causando la sílice mesoporosa, ya que el "sistema inmune" de las plantas se activó de manera generalizada.

La actividad antioxidante aumentó y disminuyó en los tratamientos sin un patrón claro y los fenoles totales aumentaron principalmente en los tratamientos con

dosis altas (100 mg/L), pero la síntesis de flavonoides no se vio afectada por los tratamientos, bajo estas condiciones (Figura A.1, A.2 y A.3).

Cuando se obtuvieron estos resultados, se observó que los tratamientos con menor crecimiento y desarrollo morfológico para cada tipo de sílice (SBA-15 a 100 mg/L con aplicación quincenal y SBA-16 a 25 mg/L con aplicación quincenal), presentaron una alta concentración de compuestos fenólicos comparados con el control, tal aumento en la síntesis de este tipo de compuestos, fue confirmada por la sobreexpresión del gen PAL (relacionado con la síntesis de fenoles), así como de otros genes (CHS, MnSOD y POD) que en menor o mayor medida, mostraron un aumento de la actividad antioxidante y de síntesis de flavonoides (Cuadro 5.3 y 5.4).

Por lo que el bajo crecimiento y desarrollo de esos tratamientos, puede deberse a un aprovechamiento de la energía, dirigido a aumentar los metabolitos especializados, para mejorar el sistema inmune de la planta ante un factor de estrés, como lo fueron algunos tratamientos de sílice mesoporosa (Cuadro 5.3 y 5.4).

Efecto de la sílice mesoporosa ante un factor de estrés abiótico

Las evaluaciones sugirieron que había tratamientos que estaban actuando como eustresores en etapas avanzadas de crecimiento. Por lo que se desarrolló un tercer experimento, con plantas estimuladas por los tratamientos anteriores, donde fueron sometidas de forma natural a temperaturas bajas y heladas (no apropiadas para Chile) durante 6 semanas.

Los resultados mostraron que el tratamiento (SBA-15 a 25 mg/L con aplicación semanal) que inicialmente promovió el crecimiento y desarrollo de las plantas, fue altamente afectado por el frío a nivel vegetativo y productivo. Incluso, algunos tratamientos que no promovieron el crecimiento y que presentaron actividad del metabolismo especializado, si no redujeron su crecimiento y desarrollo, fueron afectados de igual manera por el frío, al grado de sufrir una muerte total por daños en los tejidos (Cuadro 5.5 y 5.6).

Cuadro 5.5 Evaluación de la producción, niveles de clorofila y metabolismo especializado de plantas tratadas con sílice mesoporosa SBA-15 ante condiciones de estrés abiótico (frio).

Variables Evaluadas	Tratamientos con SBA-15 ^a					
	Aspersión Semanal			Aspersión Quincenal		
	B	M	A	B	M	A
Número de flores	Biocompatible			Biocompatible		
Frutos cosechados	Biocompatible			Biocompatible		
Tamaño de fruto	↓****	↓****	↓****	Bio	↑***	↑****
Rendimiento (Frutos/Planta)	Biocompatible			Biocompatible		
Nivel de clorofila total	Biocompatible			Biocompatible		
Fenoles totales	N/A			Bio		↑****
Flavonoides totales				Bio		↑****
Act. Antioxidante (DPPH)				↑****		↑****
Act. Antioxidante (ABTS)				↑*		↑****

^a Comparados con un control. Simbología: SBA-15 indica el uso de la sílice mesoporosa "Santa Barbara Amorphous" con poros en arreglo hexagonal; B, M y A, indican las dosis baja (25 mg/L), media (50 mg/L) y alta (100 mg/L) utilizadas, respectivamente; Bio y Biocompatible, indican que el tratamiento no tiene un efecto ni tóxico (↓) ni bioestimulante (↑); los asteriscos indican el grado de diferencia estadística, donde * indica una $P \leq 0.05$ (significativo), ** una $P \leq 0.01$ (altamente significativo), *** una $P \leq 0.001$ (extremadamente significativo) y **** una $P \leq 0.0001$ (extremadamente significativo); las celdas grises indican análisis realizados en frutos; N/A indica que la prueba no fue realizada para ese tratamiento (sin muestras por muerte de plantas). Esta evaluación fue realizada a 15 semanas del trasplante.

Cuadro 5.6 Evaluación de la producción, niveles de clorofila y metabolismo especializado de plantas tratadas con sílice mesoporosa SBA-16 ante condiciones de estrés abiótico (frio).

Variables Evaluadas	Tratamientos con SBA-16 ^a					
	Aspersión Semanal			Aspersión Quincenal		
	B	M	A	B	M	A
Número de flores	Biocompatible			Biocompatible		
Frutos cosechados	Bio	↑*	Bio	Biocompatible		
Tamaño de fruto	↑***	↑****	↓****	↑***	↑**	↑***
Rendimiento (Frutos/Planta)	Biocompatible			Biocompatible		
Nivel de clorofila total	↑****	↑***	↑*	↑*	Bio	Bio
Fenoles totales	↑****	Bio	N/A	↑****	↑****	↑*
Flavonoides totales	↑****	↑****		↑****	↑**	↑****
Act. Antioxidante (DPPH)	↑****	Bio		↑****	↑****	↑****
Act. Antioxidante (ABTS)	↑**	↑***		↑***	↑****	Bio

^a Comparados con un control. Simbología: SBA-16 indica el uso de la sílice mesoporosa "Santa Barbara Amorphous" con poros en disposición cúbica; B, M y A, indican las dosis baja (25 mg/L), media (50 mg/L) y alta (100 mg/L) utilizadas, respectivamente; Bio y Biocompatible, indican que el tratamiento no tiene un efecto ni tóxico (↓) ni bioestimulante (↑); los asteriscos indican el grado de diferencia estadística, donde * indica una $P \leq 0.05$ (significativo), ** una $P \leq 0.01$ (altamente significativo), *** una $P \leq 0.001$ (extremadamente significativo) y **** una $P \leq 0.0001$ (extremadamente significativo); las celdas grises indican análisis realizados en frutos; N/A indica que la prueba no fue realizada para ese tratamiento (sin muestras por muerte de plantas). Esta evaluación fue realizada a 15 semanas del trasplante.

En cambio, aquellos tratamientos que antes de ser sometidos al factor de estrés abiótico, redujeron su crecimiento por efecto de la sílice mesoporosa, lograron tolerar el frio de mejor manera, para posteriormente tener una recuperación

sobresaliente con un aumento en la producción, niveles de clorofila y calidad de fruto, así como un aumento de la actividad antioxidante, contenido de fenoles y flavonoides en frutos, lo cual se describe como un efecto eustresor (Figura 5.8). Destacando la mayoría de los tratamientos a base de SBA-16 y la dosis alta (100 mg/L) de SBA-15 aplicada quincenalmente, como tratamientos con efecto promotor de la tolerancia al frío (Cuadro 5.5 y 5.6). Confirmando el efecto benéfico del silicio, ante condiciones de estrés abiótico (Luyckx *et al.*, 2017)

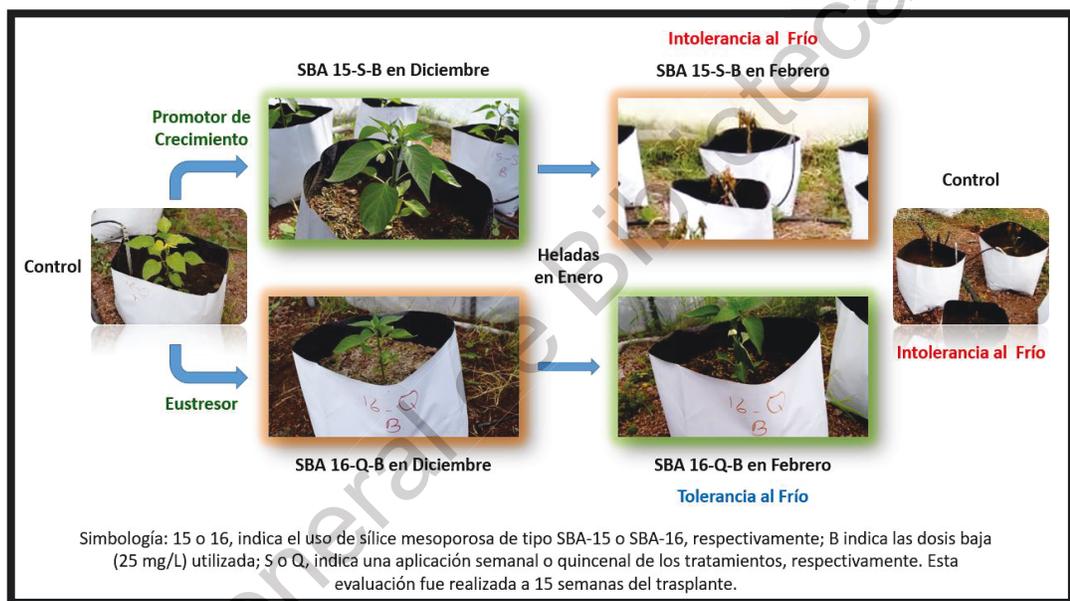


Figura 5.8 Comparación del efecto promotor de crecimiento con el efecto eustresor ante un factor de estrés abiótico (frío) en plantas de Chile sometidas a tratamientos con sílice mesoporosa.

Prueba de fitotoxicidad (estancia de investigación)

Una vez evaluado el efecto de la sílice mesoporosa durante todas las etapas fenológicas con dosis usuales (menores a 100 mg/L), se propuso un experimento con las dosis más elevadas (100 mg/L, 1, 000mg/L y 2, 000 mg/L), para procurar escenarios de fitotoxicidad, el cual se llevó a cabo durante una estancia de investigación en New Haven, Connecticut, USA en los meses de enero a junio de 2019. Donde contrario a lo que se esperaba, no se observaron efectos fitotóxicos

en variables morfológicas, niveles de clorofila y de producción con ninguno de los tratamientos utilizados, bajo condiciones ambientales regulares y apropiadas para el cultivo de chiles (Cuadro 5.7 y 5.8).

Cuadro 5.7 Evaluación de fitotoxicidad en variables morfológicas, niveles de clorofila y de producción en plantas tratadas con sílice mesoporosa SBA-15.

Variables Evaluadas	Tratamientos con SBA-15 ^a																	
	Irrigación			Dipping/Aspersión														
	B	M	A	B	M	A												
Altura de planta	Biocompatible			Biocompatible														
Grosor del tallo				Biocompatible														
Número de hojas	Biocompatible			↑***	↑*	↑***												
Área foliar relativa				Biocompatible														
Nivel de clorofila total							Biocompatible											
Peso fresco										Biocompatible								
Peso seco													Biocompatible					
Porcentaje de agua																Biocompatible		
Número de flores																		

^a Comparados con un control. Simbología: SBA-15 indica el uso de la sílice mesoporosa "Santa Barbara Amorphous" con poros en arreglo hexagonal; B, M y A, indican las dosis baja (100 mg/L), media (1000 mg/L) y alta (2000 mg/L) utilizadas, respectivamente; Bio y Biocompatible, indican que el tratamiento no tiene un efecto ni tóxico (↓) ni bioestimulante (↑); los asteriscos indican el grado de diferencia estadística, donde * indica una P≤0.05 (significativo), ** una P≤0.01 (altamente significativo), *** una P≤0.001 (extremadamente significativo) y **** una P≤0.0001 (extremadamente significativo); N/A, indica que la prueba no fue realizada para ese tratamiento. Esta evaluación fue realizada a 10 semanas del trasplante.

Cuadro 5.8 Evaluación de fitotoxicidad en variables morfológicas, niveles de clorofila y de producción en plantas tratadas con sílice mesoporosa SBA-16.

Variables Evaluadas	Tratamientos con SBA-16 ^a																				
	Irrigación			Dipping/Aspersión																	
	B	M	A	B	M	A															
Altura de planta	Biocompatible			Biocompatible																	
Grosor del tallo				Biocompatible																	
Número de hojas	Biocompatible			↑*	Bio	↑****															
Área foliar relativa				Biocompatible																	
Nivel de clorofila total							Bio	↑*	Bio	Biocompatible											
Peso fresco							Biocompatible														
Peso seco													Biocompatible								
Porcentaje de agua																Bio	Bio	↑**	Biocompatible		
Número de flores																Biocompatible					

^a Comparados con un control. Simbología: SBA-16 indica el uso de la sílice mesoporosa "Santa Barbara Amorphous" con poros en disposición cúbica; B, M y A, indican las dosis baja (100 mg/L), media (1000 mg/L) y alta (2000 mg/L) utilizadas, respectivamente; Bio y Biocompatible, indican que el tratamiento no tiene un efecto ni tóxico (↓) ni bioestimulante (↑); los asteriscos indican el grado de diferencia estadística, donde * indica una P≤0.05 (significativo), ** una P≤0.01 (altamente significativo), *** una P≤0.001 (extremadamente significativo) y **** una P≤0.0001 (extremadamente significativo); N/A, indica que la prueba no fue realizada para ese tratamiento. Esta evaluación fue realizada a 10 semanas del trasplante.

Resultados que al ser contrastados con evaluaciones anteriores, parecen formar una curva hormética inversa (Figura A.5), donde las dosis bajas (menores a 50 mg/L) presentan más frecuentemente efectos indeseados y a medida que la dosis aumenta (mayores a 100 mg/L), la biocompatibilidad de la sílice mesoporosa aumenta, así como se vuelven más frecuentes los efectos positivos (promotor de crecimiento) en diversas variables (Cuadro 5.7 y 5.8). En investigaciones anteriores, se obtuvieron resultados similares con pruebas realizadas en trigo y lupino, que en dosis superiores a los 500 mg/L, llegaron a reportar un incremento en la biomasa de las plantas, relacionada a la actividad fotosintética de los cloroplastos con MSN trasladados desde la raíz hasta los tallos y hojas por medio del xilema, una vez que entraron vía apoplasto/simplasto, y que aún en la dosis más alta utilizada (2, 000 mg/L) no se mostraron señales de estrés oxidativo (Sun *et al.*, 2016).

Cuadro 5.9 Análisis elemental por ICP-OES (Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente) de plantas tratadas con sílice mesoporosa SBA-15.

Elementos (ug/g de muestra)	Tratamientos con SBA-15 ^a																	
	Irrigación									Dipping/Aspersión								
	B			M			A			B			M			A		
	H	R	F	H	R	F	H	R	F	H	R	F	H	R	F	H	R	F
Fósforo (P)									↑****				Bio			Bio		↓***
Potasio (K)									Bio				Bio			Bio		↓****
Calcio (Ca)									Bio				Bio			Bio		Bio
Magnesio (Mg)									Bio				Bio			Bio		Bio
Azufre (S)									↑**				Bio			↑*		↓****
Hierro (Fe)	Bio	Bio	N/A	Bio	Bio	N/A	Bio	Bio	↑***	Bio	Bio	N/A	Bio	Bio	N/A	Bio	Bio	Bio
Zinc (Zn)									↑*				Bio			Bio		↓**
Cobre (Cu)									↑****				Bio			Bio		↑**
Molibdeno (Mn)									↑***				Bio			Bio		Bio
Boro (B)													↑*			Bio		↓*
Silicio (Si)									Bio				Bio			Bio		Bio

^a Comparados con un control. Simbología: SBA-15 indica el uso de la sílice mesoporosa "Santa Barbara Amorphous" con poros en arreglo hexagonal; B, M y A, indican las dosis baja (100 mg/L), media (1000 mg/L) y alta (2000 mg/L) utilizadas, respectivamente; H, R o F, indican que el análisis fue realizado en hoja, raíz o fruto, respectivamente; Bio, indica que el tratamiento no tiene un efecto ni tóxico (↓) ni bioestimulante (↑); los asteriscos indican el grado de diferencia estadística, donde * indica una Ps0.05 (significativo), ** una Ps0.01 (altamente significativo), *** una Ps0.001 (extremadamente significativo) y **** una Ps0.0001 (extremadamente significativo); N/A, indica que la prueba no fue realizada para ese tratamiento. Esta evaluación fue realizada a 10 semanas del trasplante.

Finalmente, un análisis elemental por espectrometría ICP-OES, mostró que el balance en la mayoría de los tratamientos se mantiene regular en comparación con el control. Hay casos en los que existe diferencia significativa, donde el aumento generalizado de elementos, puede indicar promoción de crecimiento y desarrollo;

un aumento en la concentración de calcio o magnesio en la parte aérea, puede indicar una respuesta al estrés o actividad fotosintética, respectivamente; mientras que el desbalance elemental en los frutos con las dosis más elevadas, puede deberse a la promoción de crecimiento del área foliar (Cuadro 5.9 y 5.10).

Cuadro 5.10 Análisis elemental por ICP-OES (Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente) de plantas tratadas con sílice mesoporosa SBA-16.

Elementos (ug/g de muestra)	Tratamientos con SBA-16 ^a																		
	Irrigación						Dipping/Aspersión						Dipping/Aspersión						
	B		M		F		A		B		M		A		A		F		
	H	R		H	R		H	R	F	H	R	F	H	R	F	H	R	F	
Fósforo (P)	Bio	Bio					Bio	Bio	Bio										↓***
Potasio (K)	Bio	Bio					↑**		↓**										↓***
Calcio (Ca)	↑***	Bio					Bio												Bio
Magnesio (Mg)	↑*	Bio					Bio		Bio										Bio
Azufre (S)	Bio	Bio					↓*		↓**										↓****
Hierro (Fe)	↑*	↑*	N/A	Bio	Bio	N/A	Bio	Bio	Bio	Bio	Bio	N/A	Bio	Bio	N/A	Bio	Bio		↑****
Zinc (Zn)	Bio	Bio					Bio		Bio										↓*
Cobre (Cu)	Bio	Bio					Bio		Bio										Bio
Molibdeno (Mn)	Bio	Bio					Bio		↑***										Bio
Boro (B)	Bio	Bio					Bio		↑***										Bio
Silicio (Si)	Bio	Bio					Bio		Bio										↑*

^a Comparados con un control. Simbología: SBA-16, indica el uso de la sílice mesoporosa "Santa Barbara Amorphous" con poros en disposición cúbica; B, M y A, indican las dosis baja (100 mg/L), media (1000 mg/L) y alta (2000 mg/L) utilizadas, respectivamente; H, R o F, indican que el análisis fue realizado en hoja, raíz o fruto, respectivamente; Bio, indica que el tratamiento no tiene un efecto ni tóxico (↓) ni bioestimulante (↑); los asteriscos indican el grado de diferencia estadística, donde * indica una P<0.05 (significativo), ** una P<0.01 (altamente significativo), *** una P<0.001 (extremadamente significativo) y **** una P<0.0001 (extremadamente significativo); N/A, indica que la prueba no fue realizada para ese tratamiento. Esta evaluación fue realizada a 10 semanas del trasplante.

La acumulación de silicio en la planta, evaluada por este método, sólo muestra un aumento significativo en el fruto con la dosis más elevada (2, 000 mg/L) de SBA-16 aplicado por Dipping/Aspersión, pero la baja significancia y falta de presencia en otros tejidos, puede deberse a una acumulación de sílice en el exterior del fruto (Cuadro 5.10). Mostrando que las SBA con morfología distinta, en el rango de concentraciones evaluadas, no tiene impacto negativo en el crecimiento o desarrollo de las plantas, similar a lo reportado en un estudio reciente con nanopartícula de sílice mesoporoso (Sun *et al.*, 2016).

VII. CONCLUSIONES

Resumen de Resultados

Los materiales nanoestructurados de sílice mesoporosa (SBA-15 y SBA-16) modificados para obtener características de interés, fueron sintetizados exitosamente y evaluados en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.). Considerándose biocompatibles en la mayoría de las circunstancias evaluadas, con algunos efectos fitotóxicos en dosis por debajo de 50 mg/L, pero con importantes efectos benéficos (promotor de crecimiento o eustresor) por encima de los 100 g/L, en el crecimiento, desarrollo y tolerancia ante estrés abiótico, dependiendo de la etapa fenológica de la planta, dosis utilizada y morfología de la sílice, comparados con un tratamiento control. Esto además de que el análisis elemental por medio de ICP-OES, no mostró resultados altamente significativos, que señalen una acumulación anormal de silicio en los tejidos. Mostrando la idoneidad de algunos tratamientos, para su uso como un sistema de entrega de químicos y sustancias en plantas de chile, sin causar respuestas adversas importantes en el crecimiento y desarrollo de las plantas, aunado a la aparición de efectos positivos intrínsecos a los materiales, que al ser aplicados, por sí mismos ya presentan una buena opción para su uso con objetivos específicos en un cultivo de chile.

Conclusión

Bajo las condiciones en las que fue realizada esta investigación, se puede concluir que la hipótesis es verdadera debido a que, además de confirmarse la alta biocompatibilidad de la sílice mesoporosa SBA-15 y SBA-16, se observaron numerosos efectos benéficos de diferentes tipos, intrínsecos a la aplicación de los materiales en el crecimiento y desarrollo de plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.), dependiendo de la etapa fenológica, dosis utilizada y morfología de la sílice, comparadas con un tratamiento control.

Sugerencias

- ❖ Cuantificar el tamaño de la sílice mesoporosa, para conocer si hay ingreso a la planta, así como entender su modo de acción.
- ❖ Realizar microscopía a los tejidos vegetales expuestos, para evaluar la bioacumulación y translocación de la sílice mesoporosa.
- ❖ Realizar pruebas de control de organismos fitopatógenos.
- ❖ Realizar pruebas organolépticas y nutricionales a frutos expuestos.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Rincón, V. H., T. Corona Torres, P. López López, L. Latournerie Moreno, M. Ramírez Meraz, H. Villalón Mendoza y J. A. Aguilar Castillo. 2010. Los chiles de México y su distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, ITConkal, UANL, UAN. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 114 p.
- Aguilar-Rincón, Víctor H. 2012. Cultivo del chile en México. *Revista fitotecnia mexicana*, 35 (4), 264.
- Alberta Government. 2016. Seed testing standards manual. Agriculture and Forestry. Canada.
- Arellano, N., Pérez Zurita, M. J., Sazo, V., de Navarro, C. y U., López, C. M. 2008. Síntesis de sílices mesoporosas tipo SBA-15 a partir de un silicato de sodio de Venezuela. *Cientific Journal of the Experimental Faculty of Sciences, at the Universidad de Zulia* Volume 16 N° 2, April-June.
- Andrade, G. F., Soares, D. C. F., dos Santos, R. G., y Sousa, E. M. B. 2013. Mesoporous silica SBA-16 nanoparticles: synthesis, physicochemical characterization, release profile, and in vitro cytocompatibility studies. *Microporous and Mesoporous Materials*, 168, 102-110.
- Ashkavand, P., Tabari, M., Zarafshar, M., Tomášková, I., y Struve, D. 2015. Effect of SiO₂ nanoparticles on drought resistance in hawthorn seedlings. *Forest Research Papers*, 76(4), 350-359.
- Ayala-Villegas, Misael J., Ayala-Garay, Óscar J., Aguilar-Rincón, Víctor H., Corona-Torres, Tarsicio. 2014. Evolución de la calidad de semilla de *Capsicum annuum* L. Durante su desarrollo en el fruto *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 37, núm. 1, 79-87
- Buzea, C., Pacheco, I. I., y Robbie, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4).
- Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G., y Oomah, B. D. 2002. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(24), 6975-6980.
- Caruso, G., Merlo, L., y Caffo, M. 2014. *Innovative Brain Tumor Therapy*. Woodhead Publishing. 167-173.
- Castañón-Nájera, G, Latournerie-Moreno, L, Leshner-Gordillo, JM, de la Cruz-Lázaro, E, y Mendoza-Elos, M. 2010. Identificación de variables para

caracterizar morfológicamente colectas de chile (*Capsicum* spp.) en Tabasco, México. *Universidad y ciencia*, 26(3), 225-234.

CIQA Centro de Investigación en Química Aplicada. 2017. *Agro nanotecnología: Nuevo paradigma científico en la producción de alimentos*. Saltillo, Coahuila, México.

Colvin, V. L. 2003. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature biotechnology*, 21(10), 1166.

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., y Liu, R. H. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 3010-3014.

Duhan, J. S., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P., Nehra, K., y Duhan, S. 2017. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports*, 15, 11-23.

Easlon, H. M., y Bloom, A. J. 2014. Easy Leaf Area: Automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area. *Applications in plant sciences*, 2(7).

Feregrino-Perez, A. A., Magaña-López, E., Guzmán, C., y Esquivel, K. 2018. A general overview of the benefits and possible negative effects of the nanotechnology in horticulture. *Scientia horticultrae*, 238, 126-137.

Flodström, K., y Alfredsson, V. 2003. Influence of the block length of triblock copolymers on the formation of mesoporous silica. *Microporous and Mesoporous Materials*, 59(2-3), 167-176.

Fukumoto, L. R., y Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3597-3604.

Griffin, S., Masood, M. I., Nasim, M. J., Sarfraz, M., Ebokaiwe, A. P., Schäfer, K. H. Jacob, C. 2017. *Natural Nanoparticles: A Particular Matter Inspired by Nature*. Antioxidants (Basel, Switzerland), 7(1), 3.

Google. 2019. Sitio web <https://goo.gl/maps/FmvcPCRuZq3brfVn9>. Consultado el 19 de julio de 2019.

Harris Moran. 2015. HMX 4664 F1. Semillas Harris Moran Mexicana, S.A. de C.V.

Hussain, H. I., Yi, Z., Rookes, J. E., Kong, L. X., y Cahill, D. M. 2013. Mesoporous silica nanoparticles as a biomolecule delivery vehicle in plants. *Journal of nanoparticle research*, 15(6), 1676.

- Hwang, Y. K., Chang, J. S., Kwon, Y. U., y Park, S. E. 2004. Microwave synthesis of cubic mesoporous silica SBA-16. *Microporous and Mesoporous Materials*, 68(1-3), 21-27.
- IPGRI, AVRDC y CATIE. 1995. *Descriptores para Capsicum (Capsicum spp.)*. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia. Centro Asiático para el Desarrollo y la Investigación relativos a los Vegetales, Taipei, Taiwán y Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.
- ISTA. 2015. *International Rules for Seed Testing 2015*. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
- Katiyar, A., Yadav, S., Smirniotis, P. G., y Pinto, N. G. 2006. Synthesis of ordered large pore SBA-15 spherical particles for adsorption of biomolecules. *Journal of Chromatography A*, 1122(1-2), 13-20.
- Khodakovskaya, M.V., Kim, B.-S., Kim, J.N., Alimohammadi, M., Dervishi, E., Mustafa, T., Cernigla, C.E. 2012. Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 9, 115-123.
- Lárez-Velásquez, C., Koteich-Khatib, S., López-González, F. 2015. *Nanopartículas: Fundamentos y Aplicaciones*. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Levitt, J. 1980. *Responses of Plants to Environmental Stress, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses*. Academic Press.
- Liu, J., Yang, T., Wang, D. W., Lu, G. Q. M., Zhao, D., y Qiao, S. Z. 2013. A facile soft-template synthesis of mesoporous polymeric and carbonaceous nanospheres. *Nature communications*, 4, 2798.
- Lopes dos Santos, S. M., Barros Nogueira, K. A., de Souza Gama, M., Ferreira Lima, J. D., da Silva Júnior, I. J., Silva de Azevedo, D. C. 2013. Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica (SBA-15 and SBA-16) for adsorption of biomolecules, In *Microporous and Mesoporous Materials*, Volume 180, Pages 284-292.
- Luyckx, M., Hausman, J. F., Lutts, S., y Guerriero, G. 2017. Silicon and plants: current knowledge and technological perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 8, 411.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y. y Kolmakov, A. 2010. Interactions between Engineered Nanoparticles (ENPs) and Plants: Phytotoxicity Uptake and Accumulation. *Science of the Total Environment*. 408. 3053-3061.

- Mahakham, W., Sarmah, A. K., Maensiri, S., y Theerakulpisut, P. 2017. Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. *Scientific reports*, 7(1), 8263.
- Oomah, B. D., Cardador-Martínez, A., y Loarca-Piña, G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 935-942.
- OMS Organización Mundial de la Salud. 2012. Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica.
- Pagano, L., Pasquali, F., Majumdar, S., De la Torre-Roche, R., Zuverza-Mena, N., Villani, M. y Maestri, E. 2017. Exposure of Cucurbita pepo to binary combinations of engineered nanomaterials: physiological and molecular response. *Environmental Science: Nano*, 4(7), 1579-1590.
- Palos B., V., Huerta-Aguilar, C. A., Singh, N. y Pandiyan, T. 2018. Selective recognition of Cr³⁺ in multivitamin formulations in aqueous medium by fluorescent organic-inorganic nanohybrids.
- Ponce-García, C. O., Soto-Parra, J. M., Sánchez, E., Muñoz-Márquez, E., Piña-Ramírez, F. J., Flores-Córdova, M. A., y Yáñez Muñoz, R. M. 2019. Efficiency of Nanoparticle, Sulfate, and Zinc-Chelate Use on Biomass, Yield, and Nitrogen Assimilation in Green Beans. *Agronomy*, 9(3), 128.
- Poschenrieder, C., Cabot, C., Martos, S., Gallego, B., y Barcelo, J. 2013. Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant Science*, 212, 15-25.
- Ramos Rodríguez, Rosa Ma. 1986. Crecimiento y proporcionalidad corporal en adolescentes mexicanas. UNAM. México. 506 p.
- Rauscher, H., Roebben, G., Mech, A., Gibson, N., Rauscher, H., Gibson, N., y Gibson, N. 2019. An overview of concepts and terms used in the European Commission's definition of nanomaterial.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rodríguez-Calzada, T., Qian, M., Strid, Å., Neugart, S., Schreiner, M., Torres-Pacheco, I., y Guevara-González, R. G. 2019. Effect of UV-B radiation on morphology, phenolic compound production, gene expression, and subsequent drought stress responses in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant physiology and biochemistry*, 134, 94-102.

- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M. K., Sharma, S. S., Pal, A., y Biswas, P. 2015. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International journal of biological macromolecules*, 75, 346-353.
- Siddiqui, Manzer H., Al-wahaibi, Mohamed, Mohammad, Firoz, Y. Al-Khaishany, Mutahhar. 2015. Role of Nanoparticles in Plants. *Nanotechnology and Plant Sciences: Nanoparticles and Their Impact on Plants*. 19-35.
- Sing, K. S. 1985. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). *Pure and applied chemistry*, 57(4), 603-619.
- Soto-Chilaca, G. y López-Malo, A. 2011. Nanotecnología en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 5, 1: 11-21.
- Sun, D., Hussain, H. I., Yi, Z., Siegele, R., Cresswell, T., Kong, L., y Cahill, D. M. 2014. Uptake and cellular distribution, in four plant species, of fluorescently labeled mesoporous silica nanoparticles. *Plant cell reports*, 33(8), 1389-1402.
- Sun, D., Hussain, H. I., Yi, Z., Rookes, J. E., Kong, L., y Cahill, D. M. 2016. Mesoporous silica nanoparticles enhance seedling growth and photosynthesis in wheat and lupin. *Chemosphere*, 152, 81-91.
- SQM-VITAS. 2019. Sitio web <http://www.sqm-vitas.com/es-pe/nutrici%C3%B3nvegetaldeespecialidad/informaci%C3%B3nporcultivos/pimiento.aspx>. Consultado el 19 de julio de 2019.
- Torney, F., Trewyn, B. G., Lin, V. S. Y., y Wang, K. 2007. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nature nanotechnology*, 2(5), 295.
- Tucuch-Haas, C. J., Alcántar-González, G., Ordaz-Chaparro, V. M., Santizo-Rincón, J. A., Larqué-Saavedra, A. 2012. Producción y Calidad de Chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) Con Diferentes Relaciones NH₄⁺/NO₃⁻ y Tamaño de Partícula de Sustratos. *Terra Latinoamericana*, Enero - Marzo, 9-15.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2019. *World Population Prospects 2019: Highlights*.
- Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941-2953.

- Wu, Rong-Mei, Wood, Marion, Thrush, Anthony, Walton, Eric F., Varkonyi-Gasic, Erika. 2007. Real-Time PCR Quantification of plant miRNAs using Universal ProbeLibrary Technology. *Biochemica*, 2, 12-15.
- Yang, J., Cao, W., y Rui, Y. 2017. Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms. *Journal of plant interactions*, 12(1), 158-169.
- Yin, Y. X., Wang, S. B., Zhang, H. X., Xiao, H. J., Jin, J. H., Ji, J. J., y Gong, Z. H. 2015. Cloning and expression analysis of CaPIP1-1 gene in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Gene*, 563(1), 87-93.
- Zhang, M., Gao, B., Chen, J., y Li, Y. 2015. Effects of graphene on seed germination and seedling growth. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(2), 78.
- Zhao, Dongyuan, Feng, Jianglin, Huo, Qisheng, Melosh, Nicholas, Fredrickson, Glenn H., Chmelka, Bradley F., Stucky, Galen D. 1998. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*. Vol. 279, 548-552.

ANEXOS

Dirección General de Bibliotecas UAQ

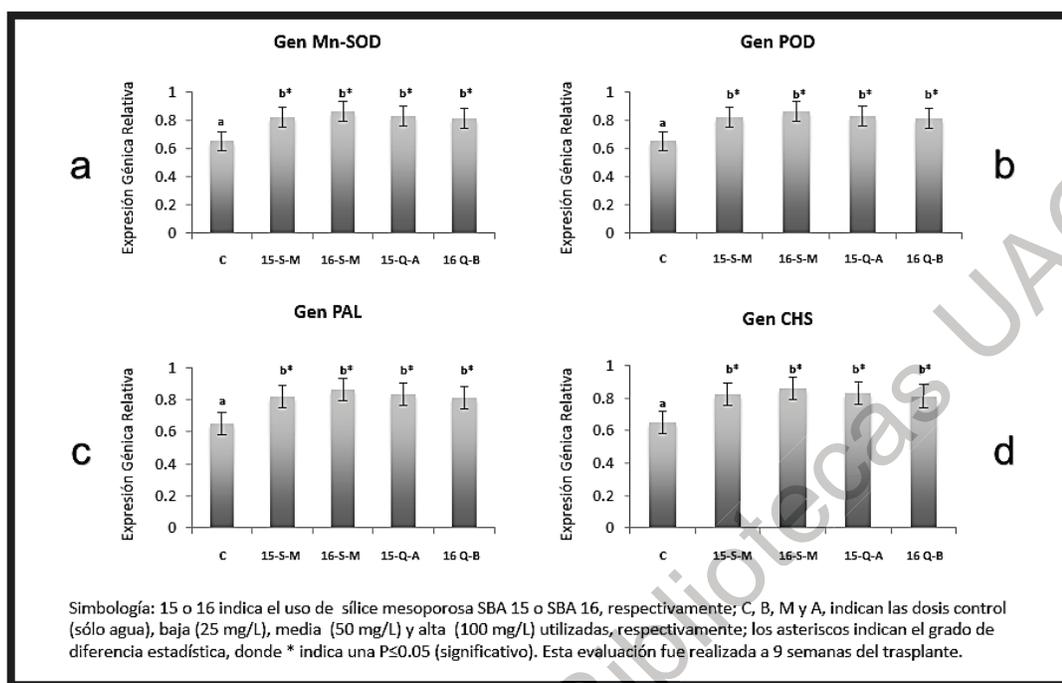


Figura A.1 Expresión relativa de los genes a) Mn-SOD, b) POD, c) PAL y d) CHS como respuesta a los tratamientos con partículas de sílice mesoporosa en plantas de Chile.

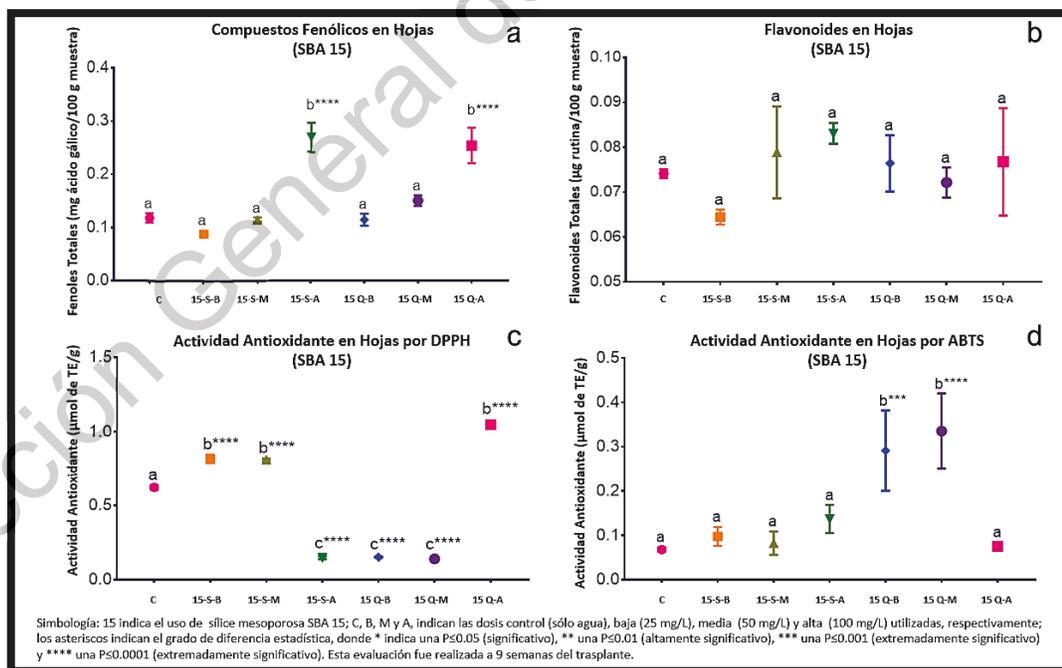


Figura A.2 Metabolitos especializados en respuesta a los tratamientos con partículas de sílice mesoporosa SBA-15 en plantas de Chile.

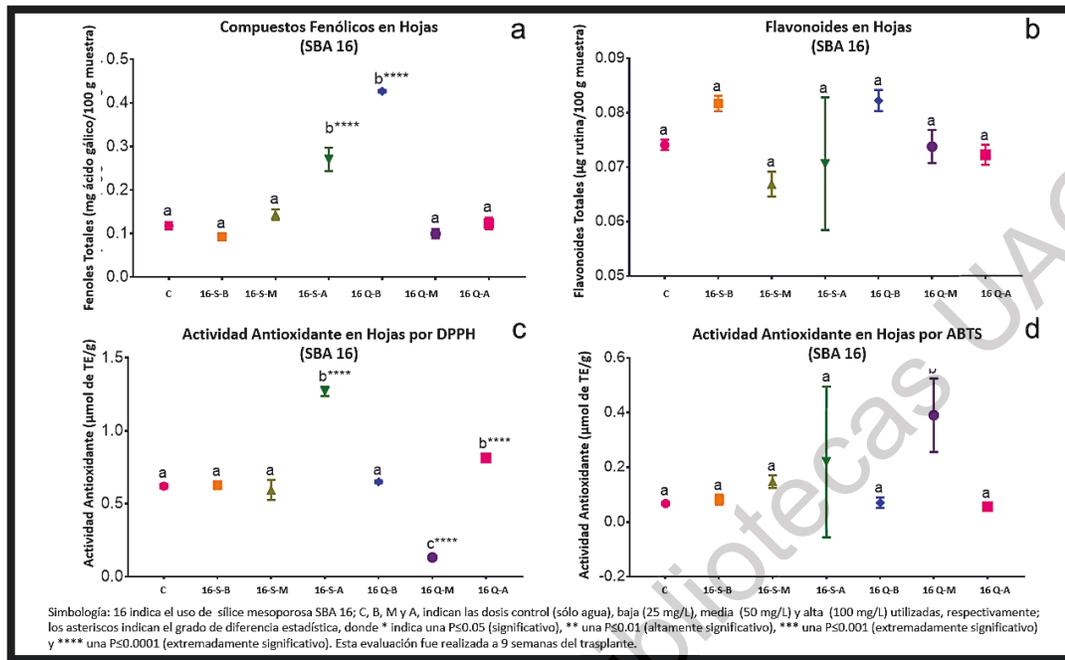


Figura A.3 Metabolitos especializados en respuesta a los tratamientos con partículas de sílice mesoporosa SBA-16 en plantas de Chile.

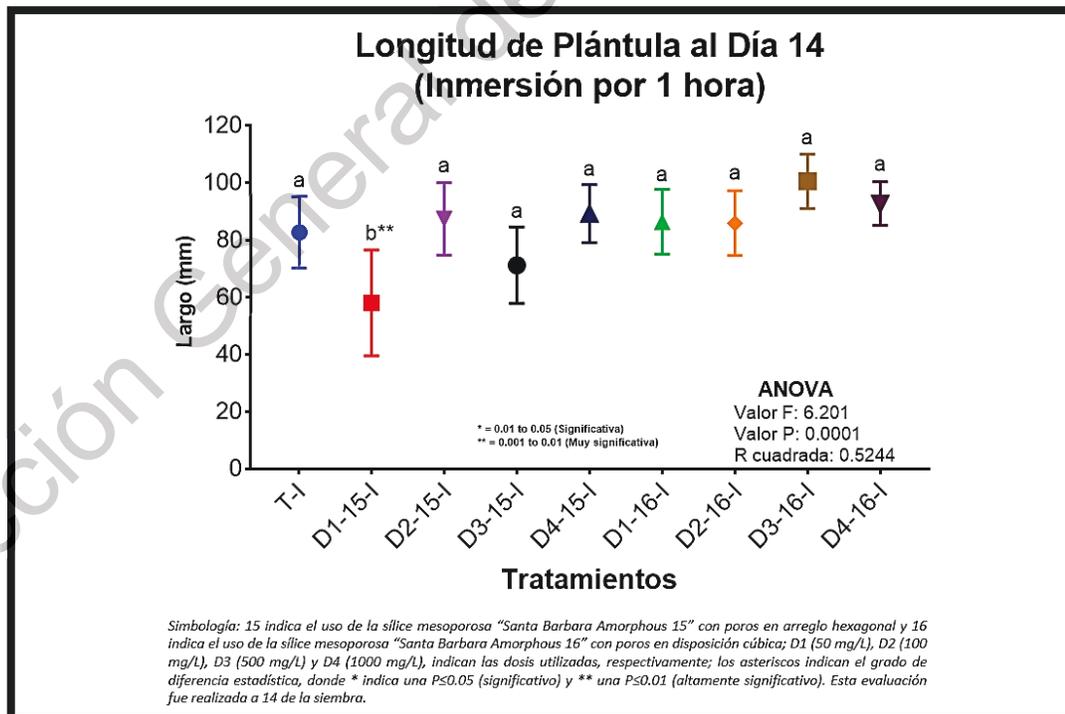


Figura A.4 Longitud de plántulas de Chile jalapeño, evaluadas al día 14 después de la siembra, con tratamientos de sílice mesoporosa, donde se observan efectos adversos en una de las dosis más bajas.

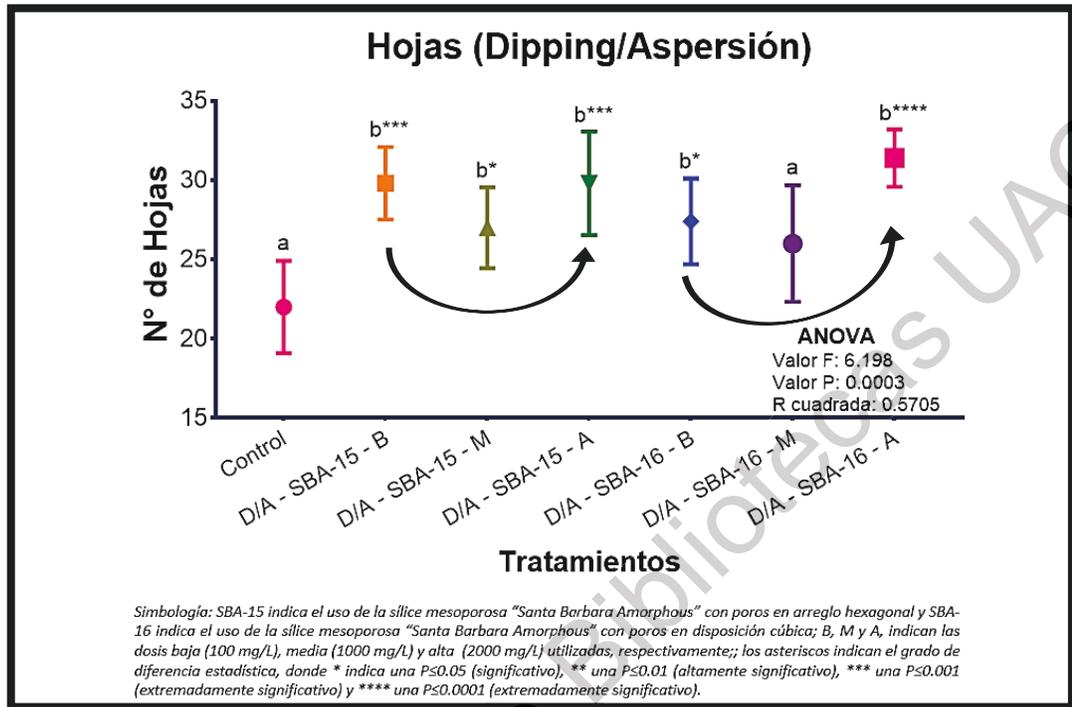


Figura A.5 Conteo de hojas de plantas de chile jalapeño, tratadas con sílice mesoporosa. Donde al observar los tratamientos de cada tipo de SBA por separado, se observa un comportamiento hormético inverso.