



INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA  
Y TECNOLÓGICA

DIVISIÓN DE CIENCIAS AMBIENTALES

**SALINIDAD Y ÓXIDO DE GRAFENO: SU INFLUENCIA EN LA  
GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE DOS  
VARIETADES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Tesis que presenta:

Q.F.B RICARDO MÉNDEZ ONTIVEROS

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Ambientales

CO DIRECTORES DE TESIS:

DR. JOSE RENÉ RANGEL MÉNDEZ

DR. JOEL DAVID FLORES RIVAS

ASESORES:

DRA. LAURA YÁÑEZ ESPINOSA

DR. CÉSAR NIETO DELGADO

ENERO DE 2018



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Salinidad y óxido de grafeno: su influencia en la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas de dos variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)**" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Ricardo Méndez Ontiveros** y aprobada el diecinueve de enero del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. José René Rangel Méndez**  
Codirector de la tesis

**Dr. Joel David Flores Rivas**  
Codirector de la tesis

**Dr. César Nieto Delgado**  
Miembro del Comité Tutorial

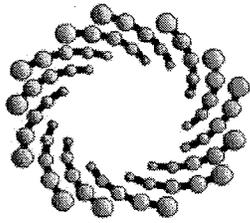
**Dra. Laura Yáñez Espinosa**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Ecología y Cambio ambiental Global de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de los doctores Joel David Flores Rivas y José René Rangel Méndez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 590492 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 053 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 19 días del mes de enero del año 2018, se reunió a las 16:10 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Laura Yáñez Espinosa</b>	<b>Presidenta</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Cesar Nieto Delgado</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Joel David Flores Rivas</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. José René Rangel Méndez</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó el C.

**Ricardo Méndez Ontiveros**

sobre la Tesis intitulada:

*Salinidad y óxido de grafeno: su influencia en la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas de dos variedades de frijol (Phaseolus vulgaris L.)*

que se desarrolló bajo la dirección de

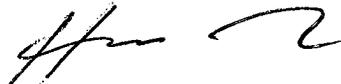
**Dr. Joel David Flores Rivas**  
**Dr. José René Rangel Méndez**

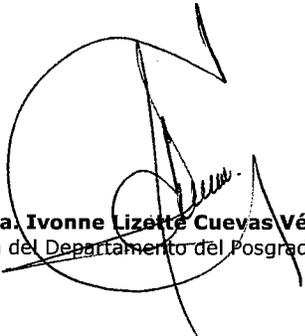
El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 17:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 19 días del mes de enero de 2018.

  
**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



## DEDICATORIA

Al Ser Supremo, que me ha guiado hasta este lugar.

A mi familia: Carmen, Maximiliano, Ángel y Rubí, por ser el motivo de querer superarme y alcanzar una nueva meta.

A mis padres, Maximiliano e Irma, por su ejemplo de amor incondicional, trabajo y disciplina.

A mis hermanos, Mónica y Max, por su amor, confianza y consejos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT), en especial a la División de Ciencias Ambientales.

Al Instituto de Investigación de Zonas Desérticas (IIZD) de la UASLP, por las facilidades para realizar parte de este proyecto.

Al comité tutorial integrado por: Dr. José René Rangel Méndez, Dr. Joel David Flores Rivas, Dra. Laura Yáñez Espinosa y Dr. César Nieto Delgado, por su conocimiento y experiencia aplicados a la realización de este proyecto.

A los técnicos: M.C. Dulce Partida, M.C. Juan Pablo Rodas, M.C. Alejandra Colunga, Dra. Araceli Patrón y M.C. Ana Iris Peña, por su valiosa ayuda.

A los académicos de la división de Ciencias Ambientales, de los cuales aprendí invaluable conocimiento.

A mis compañeros de generación: Ale, Moni, Bety, Ana, Toño, Pancho, Lupita; y especialmente a los que formaron parte del grupo de estudio, diversion y apoyo en los momentos complicados: Augusto, Javier, Andrea, Karen, Hugo y Angel.

A los que me apoyaron en esta Aventura: Frank, Neto, Carlos, Nallely,

A todos mil gracias

## CONTENIDO

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS .....	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES .....	iii
ACTA DE EXAMEN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
CONTENIDO .....	vii
INDICE.....	viii
RESUMEN .....	x
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE TABLAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS .....	xv
ABREVIATURAS .....	xviii

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Antecedentes .....	3
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	10
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	11
3.1 Objetivos Específicos .....	11
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	11
<b>5. MATERIALES Y METODOS</b> .....	11
<b>5.3 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE ÓXIDO DE GRAFENO</b> .....	14
5.3.1 Tamaño de partícula .....	14
5.3.2 Distribución de pKa .....	14
5.3.3 Cuantificación de grupos funcionales .....	15
<b>5.4 EVALUACION DE GERMINACIÓN</b> .....	16
5.4.1 Porcentaje de germinación .....	17
5.4.2 Tiempo medio de germinación.....	17
5.4.3 Tasa media de germinación .....	18
5.4.4 Índice de sincronización.....	18
<b>5.5 DESARROLLO DE PLÁNTULAS</b> .....	18
5.5.1 Longitud de tallo .....	19
5.5.2 Biomasa de parte subterránea .....	19
5.5.3 Biomasa total de plántulas.....	19
5.5.4 Relación brote:raíz .....	19
<b>5.6 MICROGRAFÍAS DE BIOMASA DE RAÍZ</b> .....	20
5.6.1 Microscopía electrónica de barrido ambiental (SEM) .....	20
5.7.1 Fijación del tejido .....	21
5.7.2 Deshidratación del tejido.....	21
5.7.3 Inclusión del tejido .....	22
5.7.3.1 Pre-infiltración.....	22
5.7.3.2 Infiltración .....	22
5.7.3.3 Polimerización.....	22

5.7.3.4 Orientación y corte de la muestra.....	23
5.7.3.5 Descripción anatómica del ápice de la raíz.....	23
5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	23
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>23</b>
<b>6.1 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE ÓXIDO DE GRAFENO .....</b>	<b>23</b>
6.1.1 Tamaño de partícula .....	23
6.1.2 Distribución de pKa para OG.....	25
6.1.3 Cuantificación de grupos funcionales .....	26
<b>6.2 EVALUACIÓN DE GERMINACIÓN.....</b>	<b>27</b>
6.2.1 Porcentaje de germinación .....	27
<b>6.3 DESARROLLO DE PLÁNTULAS.....</b>	<b>30</b>
6.3.1 Longitud de tallo .....	30
6.3.7 Variación de pH de la solución de estudio en la unidad experimental .....	37
6.3.8 Cuantificación de grupos funcionales en epidermis de raíz.....	40
<b>6.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....</b>	<b>43</b>
6.4.1 MICROGRAFÍAS SEM .....	43
6.4.2 Análisis EDS .....	46
<b>6.5 ESTRUCTURA ANATÓMICA DEL ÁPICE DE LA RAÍZ.....</b>	<b>48</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>57</b>
6.2.2 Tiempo medio de germinación.....	57
6.2.3 Tasa media de germinación .....	60
6.2.4 Índice de sincronización .....	63
<b>ANEXO II.....</b>	<b>67</b>
6.3.2 Biomasa de raíces .....	67
6.3.4 Biomasa total .....	71
6.3.5 Relación Brote:Raíz.....	74
<b>9. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>78</b>

## RESUMEN

Actualmente la producción de nanomateriales (NM) es un campo industrial con un desarrollo muy dinámico y con múltiples aplicaciones en energía, materiales, dispositivos electrónicos, manufactura y diagnóstico médico. Los NM son generalmente sistemas de partículas coloidales, con un tamaño comprendido entre 10 y 100 nm y pueden ser dispersados en el ambiente tanto por exposición accidental (por la lluvia y el viento) o intencional, como pueden ser las descargas industriales y el uso de productos comerciales que, al ser desechados, entran en las plantas de tratamiento de aguas residuales pudiendo a su vez ser dispersados por los efluentes.

Cuando los NM son dispersados, tienen el potencial de contaminar el suelo, migrar al agua superficial y profunda, e interactuar con la biota, pudiendo ocasionar efectos negativos sobre las redes alimenticias y los cultivos. Los efectos de los NM en diferentes especies de plantas pueden variar con el estado de crecimiento de la planta, método y duración de la exposición y también dependen de la forma, tipo, tamaño, composición química, concentración, estructura superficial, estabilidad, funcionalización, agregación y solubilidad de los NM.

Actualmente el óxido de grafeno (OG) es un precursor importante para la fabricación de productos electrónicos debido a la escalabilidad de su producción y aplicación, por lo que su producción se ha incrementado en tiempos recientes. Sin embargo, aún se desconocen sus posibles efectos en el ecosistema, por lo que es necesario el desarrollo de estudios que evalúen sus posibles interacciones biológicas.

Por otra parte, los ya mencionados efluentes de plantas de tratamiento, al ser empleados para cultivos agrícolas, pueden presentar otros desafíos, como es su contenido de sales disueltas, lo que ocasiona que los cultivos tengan que enfrentar la combinación de más de un factor de estrés abiótico.

En esta investigación se estudió el efecto de dos factores de estrés abiótico, NaCl y OG, tanto de manera independiente como en combinación, con el propósito de determinar y entender los posibles efectos de estos factores de estrés en los cultivos agrícolas, teniendo como planta modelo *Phaseolus vulgaris* y empleando las variedades “Bayo” y “Flor de mayo”.

En cuanto a germinación, se encontró que el porcentaje no es afectado de manera importante, en cambio otros parámetros si fueron afectados por el estrés abiótico: el tiempo medio de germinación aumentó para la variedad Bayo, mientras que disminuyó para la variedad Flor de mayo; la tasa media de germinación, al tratarse del inverso del índice anterior, también presentó diferencias. En cuanto al índice de

sincronización, para la variedad Bayo no presentó diferencias, mientras que aumentó para la variedad Flor de mayo.

En cuanto al desarrollo de las plántulas, se encontró que la longitud del tallo y la acumulación de biomasa decrecieron progresivamente al aumentar el estrés abiótico, aunque la variedad Flor de mayo fue menos afectada.

Se encontraron también diferencias entre variedades en la composición superficial de la raíz, tanto en tratamiento control como en tratamiento salino.

Por último, el análisis anatómico de la raíz de las dos variedades mostró que las partículas de OG pueden penetrar el tejido a través de la epidermis y acumularse en el citoplasma, vacuolas y apoplasto.

## ABSTRACT

Currently the production of nanomaterials (NM) is an industrial field with a very dynamic development and with multiple applications in energy, materials, electronic devices, manufacturing and medical diagnosis. NMs are generally colloidal particle systems, ranging in size from 10 to 100 nm and can be dispersed in the environment either by accidental (rain and wind) or intentional exposure, such as industrial discharges and the use of commercial products that, when discarded, enter the wastewater treatment plants and in turn may be dispersed by effluents.

When NMs are dispersed, they have the potential to contaminate the soil, migrate to surface and deep water, and interact with biota, which may have negative effects on food chains and crops. The effects of NMs on different plant species can vary with plant growth status, method and duration of exposure and also depend on the form, type, size, chemical composition, concentration, surface structure, stability, functionalization, aggregation and solubility of NM.

Currently graphene oxide (OG) is an important precursor for the manufacture of electronic products due to the scalability of its production and application, so its production has increased in recent times. However, their possible effects on the ecosystem are still unknown, so it is necessary to develop studies that evaluate their possible biological interactions.

On the other hand, the already mentioned effluents from treatment plants, when used for agricultural crops, may present other challenges, such as their dissolved salts content, which causes the crops to face the combination of more than one factor of abiotic stress.

This study investigated the effect of two factors of abiotic stress, NaCl and OG, both independently and in combination with the purpose of determining and understanding the possible effects of these stress factors on agricultural crops, having as model plant *Phaseolus vulgaris* and using the varieties “Bayo” and “Flor de mayo”.

As for germination, it was found that the percentage is not affected in an important way, in contrast other parameters if they were affected by the abiotic stress: the average time of germination increased for the bay variety, while it decreased for May flower variety; the average rate of germination, being the inverse of the previous

index, also presented differences. Regarding the synchronization index, for the variety Bayo did not present differences, while it increased for the flower variety of May.

Regarding the development of the seedlings, it was found that stem length and biomass accumulation decreased progressively with increasing abiotic stress, although the variety Flor de mayo was less affected.

Differences were also found between varieties in the root surface composition, both in control treatment and in saline treatment.

Finally, the anatomical analysis of the root of the two varieties showed that the OG particles can penetrate the tissue through the epidermis and accumulate in the cytosol, vacuoles and apoplast.

## LISTA DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Descripción taxonómica de <i>Phaseolus vulgaris</i>	12
Tabla 2. Tratamientos experimentales con las distintas concentraciones de NaCl y OG	14
Tabla 3. Distribución de pKa para OG a dos diferentes fuerzas iónicas	26
Tabla 4. Cuantificación de grupos funcionales del OG	26
Tabla 5. Tabla de ANOVA con los resultados del porcentaje de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad en dos variedades de frijol.	27
Tabla 6. Tabla de ANOVA con los resultados de longitud de tallo para los diferentes tratamientos de salinidad en dos variedades de frijol	30
Tabla 7. Cuantificación de grupos funcionales en epidermis de raíz.	42
Tabla 8. Tabla de ANOVA con los resultados del tiempo medio de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad en dos variedades de frijol	57
Tabla 9. Tabla de ANOVA con los resultados de la tasa media de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad en dos variedades de frijol.	60
Tabla 10. Tabla de ANOVA con los resultados del índice de sincronización para los diferentes tratamientos de salinidad en dos variedades de frijol.	63
Tabla 11. Tabla de ANOVA con los resultados de biomasa subterránea para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en dos variedades de frijol.	67
Tabla 12. Tabla de ANOVA con los resultados de biomasa total para los diferentes tratamientos de salinidad en dos variedades de frijol.	71
Tabla 13. Tabla de ANOVA con los resultados de la relación brote:raíz para los diferentes tratamientos de salinidad en dos variedades de frijol.	75

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Aplicaciones potenciales de Nano Materiales de Carbono	2
Figura 2. Hojuela de Grafeno prístino	2
Figura 3. Estructura del OG	3
Figura 4. Rutas de liberación de Nano Materiales en sistemas vivos	4
Figura 5. Variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> empleadas en esta investigación	12
Figura 6. Evolución de la germinación y desarrollo de brote de <i>Phaseolus vulgaris</i>	21
Figura 7. Distribución de tamaño de partícula de OG	24
FIGURA 8. Esquema general de un canal iónico	25
Figura 9. Porcentaje de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Bayo.	28
Figura 10. Porcentaje de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Flor de mayo	28
Figura 11. Longitud de tallo para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Bayo	31
Figura 12. Longitud de tallo para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Flor de mayo	31
Figura 13. Mecanismos de respuesta de raíces en presencia de salinidad. a) Variedad sensible. b) Variedad tolerante	33
Figura 14. Interacciones entre el OG y los componentes de la epidermis de la raíz de <i>Phaseolus vulgaris</i> .	34
Figura 15. Interacción entre el OG, cationes divalentes y materia orgánica	36
Figura 16. Variación de pH en tratamientos seleccionados de variedad Bayo	38
Figura 17. Variación de pH en tratamientos seleccionados de variedad Flor de mayo.	39
Figura 18. Diagrama de la estructura de la epidermis	42

Figura 19. Micrografía de muestra control de raíz de la variedad Bayo	44
Figura 20. Micrografía de muestra de raíz de la variedad Bayo en el tratamiento de 1500 ppm OG	45
Figura 21. Micrografía de muestra de raíz de la variedad Bayo en el tratamiento de 90 mM NaCl y 1500 ppm OG	46
Figura 22. Micrografía y análisis EDS de raíz de la variedad Bayo en el tratamiento de 90 mM de NaCl y 1500 ppm OG	47
Figura 23. Micrografía y análisis EDS de raíz de la variedad Flor de mayo en el tratamiento de 90 mM de NaCl y 1500 ppm OG	47
Figura 24. Sección transversal de radícula, tratamiento control de la variedad Bayo	48
Figura 25. Corte anatómico de radícula de la variedad Bayo, muestra control, 100x en microscopio de campo claro	49
Figura 26. Sección transversal de radícula de la variedad Bayo, tratamiento 1500 ppm OG, microscopio de campo claro	50
Figura 27. Diagrama de las vías apoplasto y simplasto en raíz	50
Figura 28. Sección transversal de radícula de la variedad Bayo, en el tratamiento de 90mM NaCl y 1500 ppm OG, microscopía de campo claro	51
Figura 29. Sección transversal de radícula de la variedad Flor de mayo, tratamiento control, microscopio de campo claro	52
Figura 30. Sección transversal de radícula de la variedad Flor de mayo en el tratamiento de 1500 ppm OG, microscopía de campo claro	53
Figura 31. Sección transversal de radícula de la variedad Flor de mayo en el tratamiento 60 mM NaCl y 1500 ppm OG	53
Figura 32. Sección transversal de radícula de la variedad Flor de mayo, tratamiento de 90 mM NaCl y 1500 ppm OG, microscopía de campo claro	54
Figura 33. Tiempo medio de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Bayo	58
Figura 34. Tiempo medio de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Flor de mayo	58
Figura 35. Tasa media de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Bayo	61
Figura 36. Tasa media de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Flor de mayo	62

Figura 37. Índice de sincronización para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Bayo	64
Figura 38. Índice de sincronización para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Flor de mayo	65
Figura 39. Biomasa subterránea para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Bayo	68
Figura 40. Biomasa subterránea para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Flor de mayo	68
Figura 41. Comparación de la arquitectura radicular en variedad Bayo, a) control, b) 90 mM de NaCl	70
Figura 42. Biomasa total para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Bayo	72
Figura 43. Biomasa total para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Flor de mayo	72
Figura 44. Relación brote:raíz para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Bayo	76
Figura 45. Relación brote:raíz para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Flor de mayo	76

## ABREVIATURAS

G	Grafeno
MFG	Materiales de la familia del grafeno
NM	Nano materiales
NMC	Nano materiales de carbono
NP	Nano partículas
NTC	Nano tubos de carbono
OG	Oxido de Grafeno
PCT	Películas conductoras transparentes
ROS	Especies reactivas de oxígeno

## 1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es la ciencia que interviene en la generación, manipulación y desarrollo de materiales específicos (Delgado-Ramos, 2014) que por sus características se conocen como nano materiales (NM). Generalmente, los NM son sistemas de partículas coloidales, con un tamaño comprendido entre 10 y 100 nm, con propiedades únicas como son cualidades dependientes de tamaño, elevada área superficial, forma definida, alta reactividad, así como propiedades ópticas (Al-Halafi, 2014; Dutschk *et al.*, 2014).

La nanotecnología es actualmente un campo industrial con un desarrollo muy dinámico y con múltiples aplicaciones en energía, materiales, dispositivos electrónicos, manufactura, cuidado de la salud y diagnóstico médico (Lin *et al.*, 2010; Safari & Zarnegar, 2014).

Las principales categorías de NM son: carbonosos (Baughman *et al.*, 2002), semiconductores, óxidos metálicos (Lang *et al.*, 2011; Rizzello & Pompa, 2014), lípidos (Yang & Ma, 2010), metales cero valentes (Diao & Yao, 2009), quantum dots, nanopolímeros (Ljubimova & Holler, 2012) y dendrímeros (Astruc, 2012), presentando a su vez diversas formas como nano fibras, nano cables y nano láminas (Aslani *et al.*, 2014). Actualmente existen más de 800 NM disponibles en el mercado, y se estima que esta cifra aumente en los próximos años (Safiuddin *et al.*, 2014). En el 2014, aproximadamente el 15% de los productos a nivel mundial tenían algún tipo de nanotecnología asociada a su producción (Safiuddin *et al.*, 2014).

Dentro de los NM se encuentran los Nano Materiales de Carbono (NMC). Estos materiales incluyen diferentes formas de carbono (C) de baja dimensión, como los nanotubos de carbono (NTC), los fullerenos y el grafeno (Zaytseva & Neumann, 2016).

De los NMC, recientemente, los materiales de la familia del grafeno (MFG) han sido introducidos en numerosos campos científicos como la química, la física y la ciencia de materiales (Figura 1). Los MFG son atractivos tanto en el área académica como en la industrial, debido a que pueden incrementar de manera sustancial las propiedades de los materiales a muy bajo costo. Esto se debe a características como su alta conductividad eléctrica y su moderadamente alta transmitancia óptica en el rango visible del espectro electromagnético. Debido a estas propiedades, los MFG son prometedores para la producción de películas conductoras transparentes (PCT) (Zhu *et al.*, 2010).

También existe gran interés en el uso de NMC en la agricultura, donde son empleados como nano fertilizadores (Amonio dentro de nanotubos y fulerenos), nano pesticidas (fungicidas dentro de NTC) y nano sensores (basados en NTC o Grafeno) que se emplean en agricultura de precisión para detectar plagas (Ranjan *et al*, 2016; Zaytseva & Neumann, 2016).

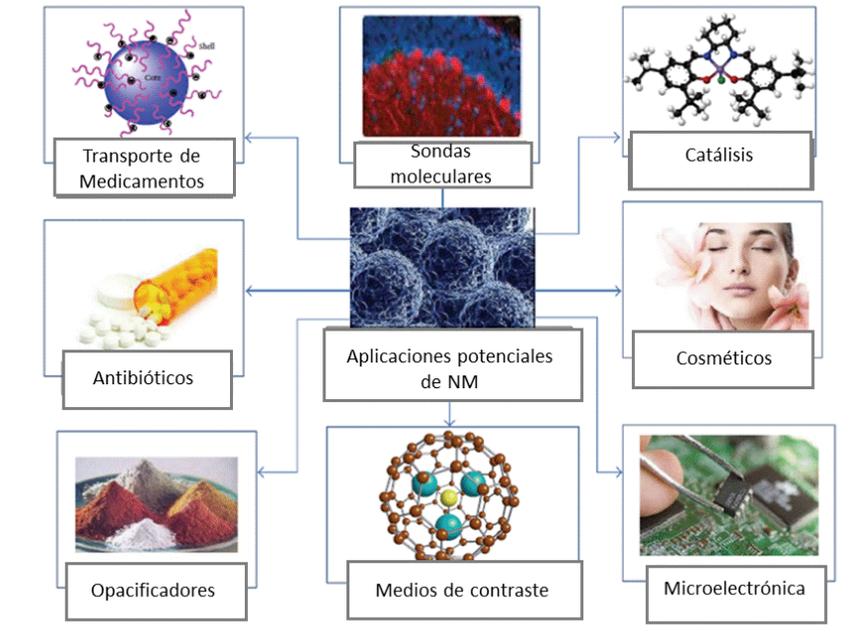


Figura 1. Aplicaciones potenciales de Nano Materiales de Carbono (modificado de Aslani *et al.*, 2014)

El grafeno (G) es una forma alotrópica del C de dos dimensiones, formada por capas de átomos de C. En el G, estos átomos presentan una hibridación  $sp^2$  y están conectados por enlaces  $\sigma$  y  $\pi$  en una red cristalina hexagonal de dos dimensiones (Figura 2). Con una distancia entre átomos de 0.142 nm, se ha determinado que es un material más resistente que el acero y, al estar constituido por una sola capa de átomos, es transparente (Zaytseva & Neumann, 2016).

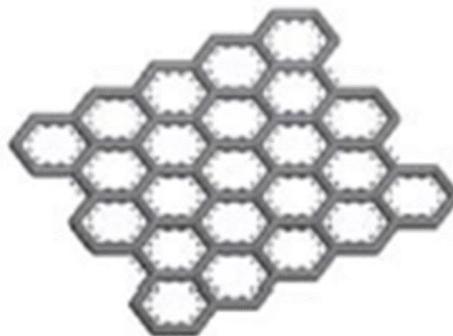


Figura 2. Hojuela de Grafeno prístino (Loh *et al.*, 2010)

Por otra parte, debido a la escalabilidad de su producción y su empleo en aplicaciones específicas, el óxido de grafeno (OG, Figura 3) es considerado como un precursor importante para la fabricación de G y PCTs. A diferencia del G, el cual está constituido solo por átomos de C, el OG presenta en su estructura diferentes grupos oxigenados, los cuales le confieren diferentes grados de reactividad (Zhu *et al.*, 2010).

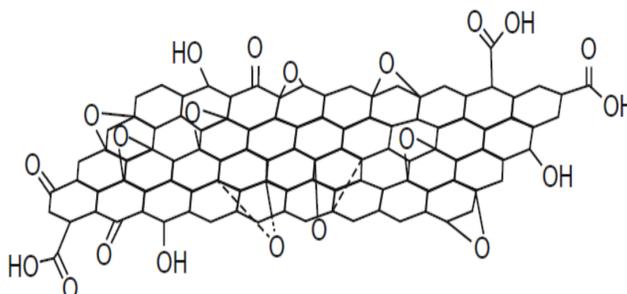


Figura 3. Estructura del OG (Gao, 2015)

Aun con su amplia utilización en el presente, es necesario revisar los métodos actuales de producción para mejorar el desempeño de los NM en aplicaciones futuras. También es necesario realizar estudios sobre los posibles riesgos relacionados con el uso de los NM y sus posibles efectos negativos, ya que las implicaciones de la nanotecnología en el medio ambiente en su mayoría aún son desconocidas, y por lo tanto, sin este conocimiento, la creación de leyes regulatorias para estos materiales permanece inviable (Fadeel *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2009; Bandyopadhyay *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2014).

Debido a que la metodología empleada en estudios de toxicidad ambiental no ha sido contundente, ha habido escepticismo en el empleo de nuevos NM, por lo que es necesaria mayor investigación al respecto (Krug & Wick, 2011). Se han realizado estudios que demuestran que tecnologías previas han generado problemas ambientales. Algunos ejemplos son los polímeros plásticos, los cuales son altamente resistentes a la degradación y representan un riesgo para la salud humana y ambiental (Galloway, 2015); la acumulación de  $\text{TiO}_2$  en la cadena trófica con un efecto de biomagnificación (Chen *et al.*, 2015) o la contaminación oceánica por el ZnO contenido en los bloqueadores solares (Spisni *et al.*, 2016).

### 1.1 Antecedentes

Debido a las propiedades de los NM, su producción y aplicación a nivel mundial ha tenido un drástico incremento y, se prevé además un aumento en el futuro cercano con su consecuente liberación en el ambiente, lo cual ha causado preocupación entre individuos y organizaciones respecto a los riesgos a la salud que conlleva el uso de NM (Galloway, 2015). Las nanopartículas, con su muy pequeño tamaño, forma geométrica y propiedades únicas, tienen el potencial de provocar toxicidad al

modificar drásticamente sus propiedades fisicoquímicas, comparadas con partículas más grandes (Ahmed & Rodrigues, 2013).

Los NM pueden atravesar barreras biológicas debido a que, por su tamaño, están en la misma escala que las moléculas que componen las células (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y organelos celulares), por lo tanto, poseen una alta actividad química y biológica (Fadeel *et al.*, 2007). Lo anterior sugiere una elevada interacción entre los NM y los sistemas biológicos (Deng *et al.*, 2014). Además, se ha reportado que la inadecuada disposición final de los NM permite a su vez su dispersión e infiltración en los ecosistemas (Galloway, 2015). Por lo anterior, se ha incrementado la investigación en el desarrollo de metodologías para su remoción del medio ambiente (Krug & Wick, 2011).

Los NM entran en contacto con los diversos sistemas vivos tanto por exposición intencional (como en las aplicaciones agrícolas), como accidental, la cual puede presentarse desde su etapa de producción, a través de efluentes industriales y domésticos, las emisiones atmosféricas, la incineración de residuos (Dutschk *et al.*, 2014) y también por el uso de productos comerciales, que a su vez, al ser desechados, entran en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Grieger *et al.*, 2009; Lide *et al.*, 2010). Todos estos factores influyen en las características fisicoquímicas de los NMC, debido a que estos procesos modifican el tamaño, el área superficial y el grado de funcionalización entre otras propiedades, lo cual influye en su biodisponibilidad (Figura 4) (Hu & Zhou, 2014; Mukherjee *et al.*, 2016).

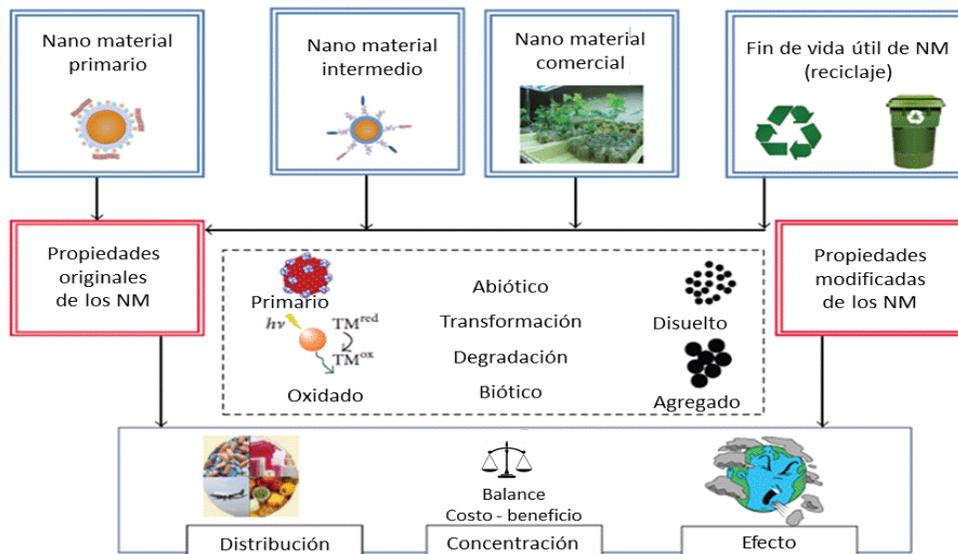


Figura 4. Rutas de liberación de Nano Materiales en sistemas vivos (modificado de Aslani *et al.*, 2014)

Una vez que los NM llegan a la tierra, tienen el potencial de contaminar el suelo o los sedimentos, migrar al agua superficial y profunda, e interactuar con la biota, incluso también pueden ser transportados a los sistemas acuáticos por la lluvia o el viento (Ostrowski *et al.*, 2009).

Bajo determinadas condiciones de crecimiento, las plantas pueden absorber tanto elementos esenciales como no esenciales, y de acuerdo a la concentración en la que se encuentren, esto puede resultar en toxicidad (Lai *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Nair *et al.*, 2010).

Se ha reportado que los elementos tóxicos sin función conocida en los sistemas biológicos, por lo general se acumulan en los tejidos vegetales y causan algún efecto letal para las especies no tolerantes (Zhang *et al.*, 2006; Lidén, 2011), lo que ocasiona un efecto negativo sobre los cultivos y las cadenas alimenticias (Aslani *et al.*, 2014).

Los efectos de los NM en diferentes especies de plantas pueden variar enormemente con el estado de crecimiento de la planta, método y duración de la exposición (Aslani *et al.*, 2014) y también dependen de la forma, tipo, tamaño, composición química, concentración, estructura superficial, estabilidad, funcionalización, agregación y solubilidad de los NM. Todas estas propiedades específicas pueden tener correlación con los efectos positivos o negativos de los NM así como de los mecanismos subyacentes a su transporte trófico (Khiew *et al.*, 2011).

Si bien existen algunos estudios que han reportado que bajas concentraciones de NMC pueden mejorar ciertas respuestas, como es el caso de *L. esculentum*, el cual, al ser tratado con bajas concentraciones de NTC, aumenta el tamaño de raíz y fruto (Haghighi *et al.*, 2014), la mayoría de los estudios reportados han demostrado que la exposición directa a diversos tipos de NM es causa de fitotoxicidad, lo cual remarca la necesidad de una eliminación ecológicamente responsable de los productos y residuos que contengan NM. También subrayan la necesidad de continuar estudiando los impactos de los NM en los sistemas agrícolas y ambientales (Aslani *et al.*, 2014). Ejemplos de cultivos que se han evaluado para la acumulación y toxicidad de NM son trigo (*Triticum aestivum*), pepino (*Cucumis sativus*), maíz (*Zea mays*), cebolla (*Allium cepa*), calabaza (*Cucurbita pepo/mixta*), jitomate (*Lycopersicon esculentum*), arroz (*Oryza sativa*), soya (*Glycine max*), lechuga (*Lactuca sativa*) y tabaco (*Nicotiana xanthi*). Dentro de estos estudios, la germinación de las semillas es un parámetro importante para evaluar la toxicidad de estos materiales en las plantas ya que en la germinación se combinan procesos anabólicos y catabólicos que a su vez son sensibles a diversos estímulos internos y externos (Deng *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015).

Se ha determinado que los NMC pueden penetrar en las células vegetales (Liu *et al.*, 2009; Khodakovskaya *et al.*, 2011) e inducir fitotoxicidad a altas dosis (Lin & Xing, 2007; Stampoulis *et al.*, 2009), por lo que algunos autores sugieren que ciertos

NMC no son 100% seguros y, por lo tanto, recomiendan gran cautela al considerar la introducción de productos basados en este tipo de NM en el mercado, ya que existe un elevado riesgo en la dispersión de éstos materiales en el ambiente. En conjunto, estos hallazgos generan una urgente necesidad de investigación en el campo de la nanotoxicología (Aslani *et al.*, 2014).

Se han reportado diferentes efectos de los NMC sobre especies vegetales, siendo éstos positivos o negativos para su desarrollo. Por ejemplo, en garbanzo (*Cicer arietinum*) se ha observado internalización de NMC, particularmente nanotubos, determinándose que una vez dentro del tejido vascular, estos NMC mejoran la eficiencia de la toma de agua, aumentando el desarrollo general de la planta teniendo por lo tanto un efecto positivo. En cuanto a efectos negativos, otros estudios reportan que los MNC quedan retenidos sobre la raíz por adsorción, lo cual puede afectar las interacciones entre plantas y microorganismos y, por lo tanto, la adquisición de nutrientes, lo que genera una disminución del desarrollo de la planta. Estos efectos se han encontrado en pepino (*C. sativus*), zanahoria (*Daucus carota*) y cebolla (*A. cepa*). También se ha reportado la reducción de la biomasa y disminución de la tasa de germinación en especies como mostaza (*Brassica alba*) y calabaza (*Curcubita pepo*). En todos los casos, se debe considerar que los efectos positivos o negativos, son dependientes de la especie de estudio, condiciones de crecimiento, concentración y tiempo de exposición (Mukherjee *et al.*, 2016).

Debido a su versatilidad en las aplicaciones presentes y futuras y la consecuente exposición a los MFG, es importante enfocar la atención en la bioseguridad de estos NM. Si bien la biocompatibilidad y la toxicidad de los MFG actualmente son el centro de atención, los riesgos para la salud y el medio ambiente en su mayoría son aún desconocidos. La investigación sobre los riesgos de los MFG en estas áreas recién está comenzando, y el propósito principal es entender y evaluar la naturaleza de los riesgos asociados con la exposición a estos materiales, incluyendo su comportamiento químico, transporte, translocación, persistencia, transformación, respuestas biológicas (toxicidad y defensa natural), enfermedades relacionadas, destino ambiental y efectos en los ecosistemas. Entender las interacciones biológicas de los MFG con metales, células, proteínas y órganos es fundamental para el futuro diseño de MFG más seguros (Hu & Zhou, 2013).

El G y el OG son considerados materiales revolucionarios cuya aplicación se ha incrementado notablemente en los últimos años, por lo tanto, es de fundamental importancia evaluar la seguridad de estos NMC, así como su impacto en la salud. Para lo anterior, se requiere entender las diferencias estructurales y de hibridación entre los distintos tipos de materiales y sus diferentes efectos biológicos. Los estudios reportados a la fecha han sido contradictorios, por ejemplo, algunos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* muestran que no existen riesgos particulares, por otro lado, otros indican que los MFG pueden llegar a ser peligrosos para la salud (Guo & Mei, 2014; Seabra *et al.*, 2014; Jastrzębska & Olszyna, 2015). Un concepto clave es que la investigación en nano seguridad debe ser parte del desarrollo de nuevas nano tecnologías. En este sentido, los MFG no pueden ser excluidos de este tipo de investigaciones (Bianco, 2013).

La liberación de nano partículas de G y OG en el medio ambiente ocurre por los desechos domésticos e industriales; se espera que la cantidad liberada continúe en aumento, por lo que se incrementaría el riesgo de exposición a los MFG ( Zhu *et al.*, 2010; Seabra *et al.*, 2014; Jastrzębska & Olszyna, 2015). Por otra parte, estudios recientes han señalado los posibles efectos adversos del grafeno sobre la salud humana (Zhang *et al.*, 2010) y en las bacterias (Akhavan & Ghaderi, 2010).

El G, el OG y los NM en general pueden desencadenar diferentes efectos sobre las especies vegetales, las cuales, a su vez, como productores primarios, pueden afectar los ecosistemas. Debido a lo anterior, es importante entender las interacciones entre los NM y las especies vegetales. Adicionalmente, las interacciones entre los NM y las plantas son particularmente importantes debido a que éstas últimas tienen estrecha relación con el suelo, el agua y la atmósfera, por lo tanto, el entender estas interacciones permitirá además, determinar el grado de dispersión de estos materiales por las plantas hacia estos compartimentos ambientales (Miralles *et al.*, 2012).

Se ha reportado toxicidad despreciable de G en el crecimiento de tomate (*L. esculentum*), aunque sólo se empleó una baja concentración (50 ppb). (Khodakovskaya *et al.*, 2011). Se ha descrito que los NM que muestran un efecto tóxico evidente sobre los cultivos alimenticios aparecen comúnmente en el intervalo de concentración de 1000-4000 ppm (Rico *et al.*, 2011). Otras investigaciones reportan que los estudios de toxicidad en cultivos alimenticios se llevan a cabo comúnmente a altas concentraciones (2000 - 5000 ppm) de NM (Lin & Xing, 2007; López-Moreno *et al.*, 2010; El-Temsah & Joner, 2012).

Uno de los estudios más relevantes es el de Begum *et al.*, 2011, en el cual se exploró si el G puede inducir fitotoxicidad a altas dosis en hortalizas expuestas a concentraciones variables (0 a 2000 ppm) de G. El rango de concentración se definió de acuerdo con las directrices de la Agencia de Protección al Ambiente de los E.U.A., (US EPA, 1996). Para la evaluación de la toxicidad, estas mismas directrices incluyen el establecimiento y evaluación de estudios sobre germinación de semillas y crecimiento de plántulas (crecimiento de raíz y brote, número de hojas), a menudo acompañadas de otras evaluaciones de muerte celular, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estudios morfológicos para obtener evidencia de síntomas *in situ* de posible toxicidad.

En cuanto al OG, se ha reportado que este puede ejercer efectos sobre los seres vivos: microorganismos, animales y vegetales. En cuanto a los primeros, se ha encontrado alteración del metabolismo de lodos activados (Ahmed & Rodrigues, 2013). En animales, por ejemplo, ocasiona aumento de la mortalidad y decremento de velocidad de nado de la larva *Nauplii* (Begum & Fugetsu, 2013).

En plantas, las NP pueden alterar el crecimiento y desarrollo, afectando la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas. Se ha descrito que los NMC pueden penetrar en células vegetales y cuando se encuentran en altas dosis inducen fitotoxicidad (Begum *et al.*, 2011). Los NMC, por ejemplo, provocan daño mitocondrial en *Arabidopsis thaliana* (Begum & Fugetsu, 2013). En col (*Brassica oleracea*); jitomate (*L. esculentum*) y amaranto (*Amaranthus tricolor*) se ha determinado que el OG provoca inhibición del crecimiento, reducción de tamaño y número de hojas (Begum *et al.*, 2011). También se ha descrito que la exposición a OG reduce el tamaño de los brotes, siendo este efecto dependiente de la concentración; además reduce también el peso fresco (Hu *et al.*, 2014). A pesar de la información anterior, son escasos los estudios reportados a la fecha referentes a otras especies vegetales (Jastrzębska & Olszyna, 2015).

Por otra parte, los ya mencionados efluentes de plantas de tratamiento, al ser empleados para cultivos agrícolas, pueden presentar otros desafíos, como es su contenido de sales disueltas, lo que ocasiona que los cultivos tengan que enfrentar la combinación de al menos dos factores de estrés abiótico.

La agricultura de riego es el mayor consumidor de agua potable del mundo. Debido a que los recursos hídricos se encuentran en disminución, muchas regiones del mundo están experimentando crecientes problemas de déficit hídricos. Esto ha generado un importante decremento en los caudales del agua superficial y en los niveles de los mantos freáticos (Hamdy, 1992).

Otros factores que incrementan la problemática antes mencionada es la contaminación del agua al reducir la cantidad de agua segura para el consumo humano; y el cambio climático, ya que se proyecta que este alterará el patrón de lluvias generando temporadas secas más intensas y prolongadas, por lo que se estima que un aumento en la temperatura global podría llevar a una situación en la que de uno a dos mil millones de personas no cuenten con agua suficiente para satisfacer sus necesidades de consumo, higiene y alimentarias (Winpenny *et al.*, 2013).

Dado que la agricultura provee el alimento de la población mundial, ésta continuará desarrollándose. Sin embargo, la escasez de suministros de agua para satisfacer las necesidades de la agricultura y del rápido crecimiento poblacional, ha generado que la atención se enfoque en el aprovechamiento de recursos hídricos no convencionales, en particular los efluentes de aguas residuales (Hamdy, 1992; Winpenny *et al.*, 2013).

El agua residual tratada puede ser usada para irrigación agrícola, industria, recarga de mantos acuíferos y, en casos especiales, con el tratamiento adecuado pueden ser usadas para suministro municipal, permitiendo destinar el agua potable para uso doméstico. Debido a lo anterior, la reutilización en agricultura de las aguas residuales tratadas es una opción que se está estudiando y adoptando cada vez más en regiones con escasez de agua (Hamdy, 1992). Por este motivo es que los

efluentes de aguas residuales han sido incluidos en los planes nacionales de desarrollo de diversos países, incluido México (CONAGUA, 2009).

Se estima que en zonas áridas y semiáridas, el reciclaje de agua tendrá un gran impacto en los futuros suministros de agua útil, más que cualquier otra tecnología, tales como la cosecha de agua, desalinización de agua marina, modificación del clima o lluvia artificial (Hamdy, 1992).

Durante el crecimiento de los cultivos, las plantas usualmente están expuestas a diferentes factores de estrés ambiental, los cuales limitan su crecimiento y productividad. Dentro de éstos factores, la salinidad y la sequía son de los más graves. Se ha estimado que más del 20% del total de tierras cultivadas a nivel mundial contienen niveles altos de sal, suficientes para causar estrés salino en los cultivos (Maghsoudi Moud & Maghsoudi, 2008).

En ambientes salinos, la adaptación de las plantas a la salinidad durante la germinación y las primeras etapas de desarrollo es crucial para el establecimiento de las plantas. La etapa de plántula es la más vulnerable en el ciclo de vida de las plantas y la germinación determina cuándo y dónde comienza el desarrollo de las plántulas (Llanes *et al.*, 2005; Kaymakanova, 2009).

El efecto más común a causa de la salinidad es el retraso general del crecimiento de la planta (Gama *et al.*, 2007). Cuando la concentración de sales en el suelo sobrepasa un nivel de 4 dS, la velocidad de crecimiento y el tamaño de la mayoría de las especies decrecen progresivamente. Esto ocurre debido a que, al aumentar la cantidad de sales disueltas en el suelo, disminuye el potencial hídrico de éste, por lo que disminuye también la cantidad de agua disponible para las especies vegetales (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2012)

Se ha demostrado mediante determinaciones de tasa de germinación, longitud del tallo, ramificación y el tamaño de las hojas que las concentraciones altas de sales afectan las etapas de germinación y desarrollo de plántulas, las cuales son cruciales para el establecimiento de las especies vegetales (Gutierrez-Rodriguez *et al.*, 2005; Gama *et al.*, 2007). Aunque se ha demostrado que la salinidad afecta a la mayoría de las especies vegetales, la respuesta es distinta entre especies e inclusive entre variedades (Kaymakanova, 2009).

De los cultivos agrícolas, y dentro del grupo de las leguminosas que poseen semillas comestibles, el frijol común es considerado uno de los más importantes (Cokkizgin, 2012). En varias regiones del mundo es un componente esencial de la dieta. También representa un cultivo importante por su capacidad fijadora de nitrógeno (Ulloa *et al.*, 2011). En México el frijol se produce en los ciclos agrícolas primavera-

verano y otoño-invierno. En el segundo ciclo, se realiza en condiciones de humedad residual, proceso que favorece la salinidad del suelo (Campo Mexicano, 2005).

En las regiones con clima semi desértico, los efectos de la salinidad se incrementan, debido a que la concentración salina aumenta y las sales de menor solubilidad precipitan (Miyamoto & Pingitore, 1992). Se ha demostrado que una de las sales que permanece en las soluciones salinas de los suelos bajo condiciones de humedad residual es el NaCl, por su alta solubilidad (Ayers & Westcot., 1985).

Las variedades del frijol se pueden clasificar de acuerdo a diversos criterios. Por su consumo como grano seco y como grano y vaina verde; desde el punto de vista agronómico se utilizan características como la duración del periodo vegetativo y se habla de variedades precoces o tardías; en cuanto a la reacción al fotoperiodo se dice de variedades sensibles a la luz, insensibles o neutras y en lo que respecta a factores limitantes de la producción se ubica a las variedades en al menos las resistentes y susceptibles.

Aunque a nivel mundial todas las variedades de frijol quedan incluidas en los criterios anteriormente señalados, a nivel práctico, los países en particular clasifican a sus variedades de frijol de acuerdo a las características de su grano, en especial en lo relativo a su tamaño y color (Ulloa *et al.*, 2011).

Los efectos de la salinidad sobre los cultivos en general y de *P. vulgaris* en particular, son un tema ampliamente estudiado, mientras que los estudios de la toxicidad del OG sobre especies vegetales es un tema relativamente reciente. Sin embargo, los estudios sobre los efectos causados por la combinación de al menos dos factores de estrés abiótico sobre cultivos son aun escasos. Debido a esto, la presente investigación aportó información novedosa en esta área de estudio.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

El OG se libera de manera progresiva y cada vez en mayores cantidades en el ambiente, siendo diseminado por las actividades antropogénicas, incluidos los efluentes de plantas de tratamiento. Existe la necesidad de profundizar en el conocimiento sobre la toxicidad de los MFG en los cultivos destinados a la alimentación y sus posibles implicaciones en la salud humana; es necesario estudiar qué efectos ocasionarán en los cultivos agrícolas que sean irrigados con estos efluentes. Por otra parte, es muy probable que dichos cultivos enfrenten más de un factor de estrés abiótico, siendo la salinidad uno de los más comunes. Por lo anterior, el propósito de esta investigación es determinar los efectos que la salinidad y el OG tendrán de manera independiente y combinada sobre los cultivos agrícolas. La especie de estudio es *Phaseolus vulgaris* empleando las variedades Flor de mayo y Bayo, debido a que son de las variedades más importantes en las regiones

semi áridas, en las cuales el empleo de efluentes para irrigación tendrá una alta relevancia.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la salinidad y el óxido de grafeno en la germinación y el desarrollo de *Phaseolus vulgaris* variedades “Bayo” y “Flor de mayo”.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

1. Determinar el efecto de la salinidad y el OG en la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de las dos variedades de *Phaseolus vulgaris*.
2. Establecer los mecanismos de interacción entre la salinidad y el OG sobre las semillas y plántulas de las dos variedades de *Phaseolus vulgaris*.

### **4. HIPÓTESIS**

La salinidad y el óxido de grafeno, de manera individual o combinada, alterarán la germinación y el desarrollo de las plántulas de frijol. En bajas concentraciones de estos compuestos existirá un efecto positivo en la germinación y desarrollo de las plántulas, presentando el efecto contrario en altas concentraciones.

### **5. MATERIALES Y METODOS**

#### **5.1 ESPECIE DE ESTUDIO**

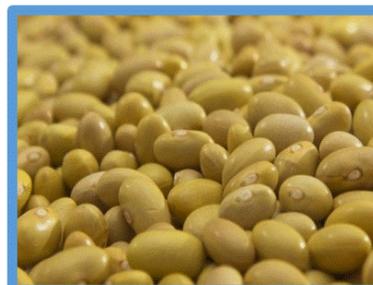
En esta investigación se trabajó con semillas comerciales de *Phaseolus vulgaris* L, variedades “Flor de mayo” y “Bayo”, por ser variedades cultivadas en climas semi áridos. Se emplearon semillas comerciales de la marca La Merced® para las dos variedades. En la Tabla 1, se presenta la descripción taxonómica de la especie de estudio. En la Figura 5 se muestran imágenes de las variedades empleadas.

Tabla 1. Descripción taxonómica de *Phaseolus vulgaris* (United States Department of Agriculture, 2016)

Descripción taxonómica			
Reino:	<i>Plantae</i>	Orden:	<i>Fabales</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>	Familia:	<i>Fabaceae</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>	Género:	<i>Phaseolus</i>
Subclase:	<i>Rosidae</i>	Especie:	<i>Phaseolus vulgaris</i>



Variedad Flor de Mayo



Variedad Bayo.

Figura 5. Variedades de *Phaseolus vulgaris* empleadas en esta investigación.

## 5.2 CONDICIONES DE EXPERIMENTACIÓN

Para los experimentos de germinación de semillas y desarrollo de plántulas se estableció como repetición 1 vaso de precipitado de 250 mL con 10 semillas, y se realizaron 4 repeticiones por tratamiento. Las diferentes soluciones experimentales se ajustaron a pH 7.0  $\pm$ 0.3.

Se seleccionaron semillas sanas de *P. vulgaris*, las cuales se desinfectaron usando NaClO al 5 % por 10 minutos, después las semillas se lavaron y posteriormente se hidrataron durante 5 h en agua desionizada. Transcurrido ese tiempo, se colocaron sobre papel absorbente durante 24 h, y a continuación se procedió a realizar la siembra en cada uno de los tratamientos. Estas etapas se realizaron en condiciones controladas con una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Los recipientes se cubrieron con vitafilm. Durante el tiempo de evaluación, se añadió diariamente 1 mL de solución experimental a cada repetición.

### 5.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los estudios de estrés salino para *Phaseolus vulgaris* reportan concentraciones de salinidad en el rango de 30 a 100 mM, (Seemann & Critchley, 1985; Gutierrez-Rodriguez *et al.*, 2005; Gama *et al.*, 2007; Zuccarini, 2008; Kaymakanova, 2009; Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2012; Chulim *et al.*, 2014) mientras que para OG, estudios previos (no publicados) dentro del grupo de trabajo, mostraron que para *Cucumis sativus*, las concentraciones de 25, 50, 100, 200, 500, 1000 y 1500 mg/L permiten estudiar la respuesta de las semillas y las plántulas a diferentes tratamientos, además, estas concentraciones están dentro del rango recomendado en los estudios de toxicidad (US EPA, 1996).

Para determinar la influencia de la salinidad y la presencia de OG en la germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas, se estableció un diseño para evaluar cada variable de manera independiente y también en sus posibles combinaciones.

La Tabla 2 muestra las concentraciones NaCl mM y las concentraciones de OG en ppm empleadas para los diferentes tratamientos experimentales. Este diseño permite analizar los factores de estrés de manera independiente (NaCl de 0 a 90 mM, OG de 0 a 1500 ppm) así como todas sus posibles combinaciones.

Como resultado del diseño experimental, las posibles variables explicativas que pueden tener influencia en las respuestas experimentales son la variedad, el NaCl, el OG, y las interacciones variedad\*NaCl, variedad\*OG, NaCl\*OG y variedad\*NaCl\*OG.

Para la realización de los diferentes tratamientos de esta investigación se empleó una suspensión de óxido de grafeno marca Graphenemarket®, con una concentración de 6.2 g/L. El NaCl empleado fue grado reactivo marca Sigma Aldrich®.

Tabla 2. Tratamientos experimentales con las distintas concentraciones de NaCl y OG.

NaCl mM	OG ppm	NaCl-OG	NaCl-OG	NaCl-OG
0	0	S 30 OG 0	S 60 OG 0	S 90 OG 0
30	25	S 30 OG 25	S 60 OG 25	S 90 OG 25
60	50	S 30 OG 50	S 60 OG 50	S 90 OG 50
90	100	S 30 OG 100	S 60 OG 100	S 90 OG 100
	200	S 30 OG 200	S 60 OG 200	S 90 OG 200
	500	S 30 OG 500	S 60 OG 500	S 90 OG 500
	1000	S 30 OG 1000	S 60 OG 1000	S 90 OG 1000
	1500	S 30 OG 1500	S 60 OG 1500	S 90 OG 1500

## 5.3 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE ÓXIDO DE GRAFENO

### 5.3.1 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula se determinó mediante un análisis en un zetámetro marca Microtac®. Para este propósito se midieron 145 µL de la suspensión de OG y se completó a un volumen de 6 mL con agua desionizada. De esta manera se obtuvo una suspensión de OG con una concentración de 150 mg/L. Se tomó 1 mL de solución y se analizó en el zetámetro. La medición se realizó 6 veces.

### 5.3.2 Distribución de pKa

La distribución de pKa del OG se determinó mediante el equilibrio de pH y fue obtenida utilizando un método de titulación potenciométrica en una tituladora automática marca Mettler Toledo®, el método se describe a continuación:

En un matraz volumétrico de 25 mL se añadieron 806.4 µL de la suspensión de OG, se pesaron 0.0146 g de NaCl los cuales se agregaron al matraz y se llevó a aforo con agua desionizada, obteniéndose 25 mL de NaCl 0.1 N. Esta solución se llevó a la tituladora automática y, cuando fué necesario, se agregó un volumen determinado de una solución 0.1N de HCl con la finalidad de ajustar el pH a un valor de 3.0 antes de iniciar el experimento. Cuando se obtuvo el pH deseado la solución fue gasificada con nitrógeno. Por último, se ejecutó el programa de titulación y se registró el pH de cada solución final. Para la titulación de OG en 90 mM de NaCl, se emplearon 0.1314 g de NaCl y se siguió el mismo procedimiento.

### 5.3.3 Cuantificación de grupos funcionales

Para la realización de este análisis, primeramente, fue necesario obtener OG lavado y seco, lo cual se realizó como se describe a continuación. De la suspensión de OG marca Graphenemarket®, se tomaron 1.5 mL y se colocaron en un tubo eppendorf, y se centrifugó por 10 min a 10, 000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se agregó agua desionizada hasta 1.5 mL, se agitó y nuevamente se centrifugó por 10 min a 10, 000 rpm. El lavado con agua desionizada se repitió una vez más. Se retiró el sobrenadante y el sedimentado se llevó a secado en un concentrador durante 4 h a 45 °C. Finalmente se obtuvo OG seco, el cual se empleó para la determinación de grupos funcionales.

Los sitios activos del OG se determinaron por el método de titulación ácido-base descrito por Boehm (1994). Este procedimiento consiste en llevar a cabo un experimento de neutralización para cada grupo funcional. Con una solución valorada de NaOH 0.1N se determinó la totalidad de sitios ácidos presentes en el OG. Con una solución valorada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 N se neutralizaron los sitios carboxílicos y lactónicos, con solución valorada de NaHCO<sub>3</sub> 0.1 N se neutralizaron los sitios carboxílicos y con una solución valorada de Etóxido de Sodio 0.1 N se neutralizaron los sitios carbonilo. Cada una de éstas determinaciones se llevó a cabo agregando 5 mg de OG en tubos Corning, los cuales contenían 25 mL de la solución neutralizante. Los tubos se sometieron a sonicación durante 10 s y se permitieron 5 min de reacción. Después, la mezcla fue centrifugada por 1 hora a 3800 rpm. Posteriormente se filtró el sobrenadante. Finalmente se tomó una alícuota de 20 ml del sobrenadante y se tituló con solución valorada de 0.1 N de HCl utilizando una tituladora automática marca Mettler Toledo®,

En las siguientes ecuaciones se muestran los sitios activos, la solución neutralizante utilizada para cada uno de ellos y cómo se calcula la concentración de cada uno de los grupos funcionales.



Dónde:

CSC= Concentración de sitios carboxílicos, (meq/g)

C\_SCL= Concentración de sitios carboxílicos y lactónicos, (meq/g)

CSL= Concentración de sitios lactónicos, (meq/g)

C\_SCLF= Concentración de sitios carboxílicos, lactónicos y fenólicos, (meq/g)

CSF= Concentración de sitios fenólicos, (meq/g)

CSAT= Concentración de sitios ácidos totales, (meq/g)

CSCa= Concentración de sitios carbonilos, (meq/g)

Las concentraciones de los sitios activos del OG se calcularon según Andrade Espinosa & Rangel Méndez (2007) y Ríos Del Toro *et al.* (2012), con la siguiente ecuación:

$$C_{SA} = \frac{V_{in} (C_{in} - C_{fn})}{m} \times 1000$$

Donde:

CSA = Concentración de sitios activos, (meq/g)

V<sub>in</sub> = Volumen inicial de la solución neutralizante, (L)

C<sub>in</sub> = Concentración inicial de la solución neutralizante, (eq/L)

C<sub>fn</sub> = Concentración final de la solución neutralizante. (eq/L)

m = Masa de OG (g)

#### 5.4 EVALUACION DE GERMINACIÓN

La germinación de las semillas es definida como una serie de procesos metabólicos y morfológicos, la cual comienza con la absorción de agua por la semilla (imbibición), y termina con la aparición de la radícula a través de las estructuras que lo rodean. En conjunto, estos procesos resultan en la transformación del embrión en una plántula, la cual posteriormente es capaz de convertirse en una planta adulta (Bewley & Bradford, 2013).

Para fines de este estudio, la etapa de germinación se consideró realizada cuando emerge la radícula entre los cotiledones. Las evaluaciones de germinación se realizaron diariamente (Chulim et al., 2014).

La germinación se evaluó durante 10 días, siendo éste el periodo de evaluación de esta investigación. Se evaluó el porcentaje de germinación, el tiempo medio de germinación, la tasa media de germinación y el índice de sincronización.

#### 5.4.1 Porcentaje de germinación

Es el porcentaje de semillas germinadas (capaces de producir una planta normal) respecto del total de semillas sembradas en condiciones determinadas (Cokkizgin, 2012). El porcentaje de germinación en un lote de semillas es importante debido que indica la proporción de semillas capaces de germinar y desarrollarse (Méndez-Hurtado *et al.*, 2013).

La fórmula mediante la cual se calcula el porcentaje de germinación es la siguiente:

$$PG = \frac{NS_G}{NS_T} \times 100$$

Donde:

$NS_G$  = Número de Semillas Germinadas

$NS_T$  = Número de Semillas Totales

#### 5.4.2 Tiempo medio de germinación

El tiempo medio de germinación fue propuesto por Haberlandt en 1875 y posteriormente empleado como longitud media de tiempo de incubación. Se calcula como la media ponderada del tiempo de germinación (hora, día o la unidad de tiempo empleada). El número de semillas germinadas en los intervalos establecidos para la recolección de datos se utiliza como medida. En términos prácticos, el tiempo medio de germinación se considera como la cantidad de unidades de tiempo que tardan en germinar al menos el 50% de las semillas en un tratamiento (Ranal & Santana, 2006; Lozano *et al.*, 2015).

La fórmula para calcular el tiempo medio de germinación es la siguiente:

$$TGM = \frac{\sum(Dn)}{\sum n}$$

Donde:

$TGM$  = Tiempo Medio de Germinación.

$\sum(Dn)$  = Número de Semillas Germinadas cada día

$D$  = Día de conteo

### 5.4.3 Tasa media de germinación

La tasa media de germinación se define como el recíproco del tiempo medio de germinación. En términos simplificados, la tasa media de germinación es la cantidad de semillas de un tratamiento que germinan en una unidad de tiempo (Lozano *et al.*, 2015).

La fórmula para cálculo de la tasa de germinación es la siguiente:

$$V = \frac{1}{TMG}$$

Donde:

TMG = tiempo medio de germinación

### 5.4.4 Índice de sincronización

Es un indicador de la homogeneidad de la germinación en una condición determinada. Este valor oscila entre 0 y 1. Cuando el valor se aproxima a 1, indica que la germinación es homogénea, por el contrario, cuando el valor se aproxima a 0, indica que la germinación no presenta homogeneidad (Lozano *et al.*, 2015)

La fórmula para calcular el índice de sincronización es la siguiente:

$$Z = \frac{\sum C_{n1,2}}{N}$$

$$C_{n1,2} = \frac{n_i(n_i-1)}{2} \quad N = \frac{\sum n_i(\sum n_i-1)}{2}$$

Donde:

$C_{n1,2}$  = Combinación de Semillas Combinadas al tiempo  $i$ , 2 juntas.

$n_i$  = Número de Semillas Germinadas en la observación  $i$ .

## 5.5 DESARROLLO DE PLÁNTULAS

Para evaluar los efectos de la salinidad y la exposición de OG en el desarrollo de plántulas de *Phaseolus vulgaris*, se midieron los siguientes parámetros: longitud de tallo, biomasa de parte subterránea, biomasa de parte aérea y biomasa total. Estas mediciones se realizaron para todos los tratamientos y las dos variedades de semillas empleadas.

### **5.5.1 Longitud de tallo**

El desarrollo del tallo es un indicador del adecuado crecimiento y establecimiento de la plántula; éste también puede ser afectado por diversos factores de estrés, por lo cual la alteración del desarrollo del tallo afectará el establecimiento de la plántula (Cornelissen *et al.*, 2003).

### **5.5.2 Biomasa de parte subterránea**

Después de la germinación, el desarrollo de la radícula (parte subterránea de la plántula), es indispensable para el establecimiento de la plántula, siendo la biomasa de la radícula un indicador de la capacidad de la plántula de crecer, desarrollarse y establecerse como plántula y prosperar ante el estrés sometido (Chandna *et al.*, 2013).

### **5.5.3 Biomasa total de plántulas**

Se evaluó el total de biomasa en peso seco que la plántula acumuló en la etapa de crecimiento, como una medida de los recursos asignados al crecimiento en los distintos tratamientos y del desarrollo normal de la plántula (Chandna *et al.*, 2013; Méndez-Hurtado *et al.*, 2013).

### **5.5.4 Relación brote:raíz**

La relación o proporción biomasa aérea/biomasa subterránea (relación brote:raíz) es uno de los principales indicadores de estrés salino en el desarrollo de muchos genotipos de cultivos. Generalmente esta proporción disminuye al aumentar el estrés, proporcionando información sobre la manera en que la planta asigna los recursos para su crecimiento de acuerdo al grado de estrés al que es sometida (Chandna *et al.*, 2013).

### **5.5.5 Variación de pH de la solución de estudio en la unidad experimental**

Con el propósito de determinar si durante el desarrollo del experimento existía una variación de la solución problema de los diferentes tratamientos, y determinar si esto se presentaba para las dos variedades, se midió el valor de pH a los 5 y a los 10 días de desarrollo de las plántulas. El valor de referencia de pH fue de  $7.0 \pm 0.2$ , el cual fue el valor al cual se ajustaron las soluciones de estudio.

### **5.5.6 Cuantificación de grupos funcionales en epidermis de raíz**

Para determinar las posibles diferencias en la composición superficial de la raíz en ambas variedades, se cuantificaron los grupos funcionales de muestras de ambas variedades cultivadas en tratamiento control y en tratamiento de 90 mM de NaCl. Aunado a esto, también se valoraron a dos distintas fuerzas iónicas del electrolito de soporte, las cuales fueron 10 y 90 mM, con el objetivo de determinar las posibles variaciones de la epidermis del tejido radicular antes un estrés salino tanto agudo como crónico. Esta valoración semicuantitativa se realizó mediante el programa SAEIUS®, el cual estima la  $f(pK)$  en  $\text{mmoles}\cdot\text{g}^{-1}$ .

## **5.6 MICROGRAFÍAS DE BIOMASA DE RAÍZ**

### **5.6.1 Microscopía electrónica de barrido ambiental (SEM)**

Con la finalidad de analizar de qué manera interactuaba el OG con la raíz, el NaCl con la raíz, así como la combinación de OG y NaCl con la raíz, se obtuvieron también micrografías de tejido seco de raíz de los tratamientos 1500 ppm de OG y de la combinación 90 mM de NaCl con 1500 ppm de OG. Para obtener imágenes de la morfología superficial del tejido de raíz, se realizó un escaneo con el microscopio electrónico ambiental ESEM Quanta FEG 250 marca FEI®. Por tratarse de muestras biológicas, no se empleó ningún recubrimiento.

### **5.6.2 Energía dispersiva de rayos X (EDS)**

Empleando las muestras utilizadas en el análisis anterior, se realizó un análisis por energía dispersiva de rayos X (EDS) con el mismo equipo, ESEM Quanta FEG 250 marca FEI®, pero en éste caso, en modo de alto vacío. Esta técnica permite determinar los porcentajes de la composición elemental de las muestras. El fundamento del análisis de EDS está basado en las interacciones entre la radiación electromagnética, el material analizado y los rayos X. La caracterización se fundamenta en el hecho de que cada elemento posee una estructura atómica única, y cuando el haz de rayos X impacta con los diferentes elementos, estos emiten una energía característica de su estructura atómica, lo que permite identificar de forma individual los distintos elementos presentes en la muestra (Goldstein *et al.*, 1992).

## **5.7 ESTRUCTURA ANATÓMICA DEL ÁPICE DE LA RAIZ**

La estructura anatómica del ápice de la raíz se analizó para los tratamientos seleccionados con base en los resultados experimentales. Se emplearon plántulas de 10 días de crecimiento con diferentes tratamientos de Salinidad y OG. En la Figura 6 se muestra la ubicación del ápice de la raíz.

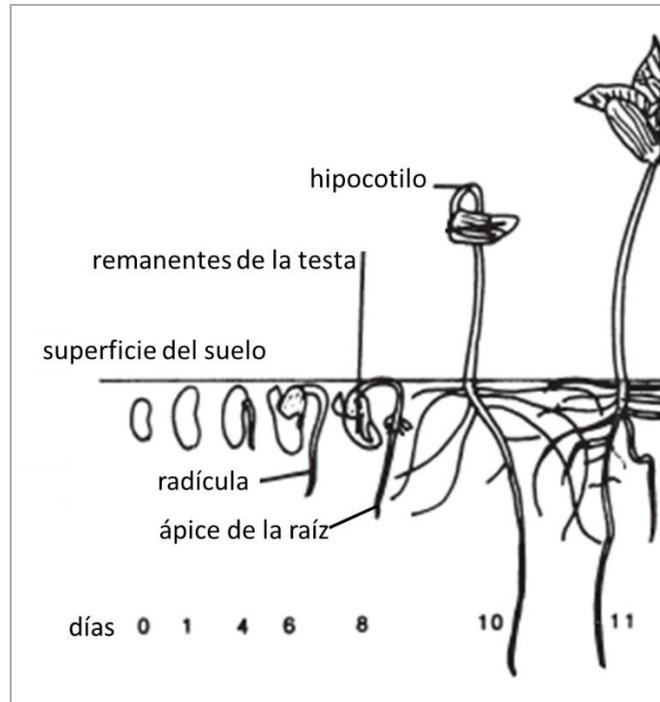


Figura 6. Evolución de la germinación y desarrollo de brote de *Phaseolus vulgaris* (modificado de Bradbeer, 1988).

El procedimiento inició con la fijación del tejido fresco de raíz con glutaraldehído grado 1, diluido al 4%. Posteriormente se realizaron tres lavados con solución buffer de fosfato (pH 7.4 **1M**). Posteriormente, se realizó la deshidratación del tejido en una serie etanólica, finalizando con la infiltración e inclusión del tejido en resina (Ruzin, 1999). Los cortes con un espesor de 1.5  $\mu\text{m}$  se realizaron con un microtomo rotatorio marca Leica®. A continuación, se describe el procedimiento:

### 5.7.1 Fijación del tejido

Las muestras de tejido se colocaron en tubos Corning de 15 mL a las cuales se les agregó glutaraldehído al 4% hasta cubrirlas por completo y se reposaron durante 48 h libres de luz y polvo.

Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con buffer de fosfatos con intervalos de 30 minutos, para eliminar el glutaraldehído.

### 5.7.2 Deshidratación del tejido

Para la deshidratación de las muestras se realizó la siguiente serie:  
 Reposo en etanol al 30% por tres horas y se decantó la solución.  
 Reposo en etanol al 50% por tres horas y se decantó la solución.  
 Reposo en etanol al 70% por 12 horas y se decantó la solución.  
 Reposo en etanol al 90% por tres horas y se decantó la solución.

Reposo en etanol al 96% por tres horas y se decantó la solución. Finalmente, en etanol al 100% (alcohol absoluto). Las muestras pueden permanecer en este tratamiento por tiempo indefinido hasta el momento de ser infiltradas en resina.

### **5.7.3 Inclusión del tejido**

Las muestras de tejido deshidratadas con el método anterior fueron infiltradas en resina epóxica (Technovit H7100®) junto con un agente catalizador que endurece la resina (Ruzin, 1999). De esta manera, el tejido queda incluido en un medio sólido, listo para los cortes con el microtomo rotatorio. La técnica se divide en tres pasos, pre infiltración, infiltración y polimerización de las muestras. Se describe la técnica a continuación:

#### **5.7.3.1 Pre-infiltración**

Se realizó una serie graduada de etanol y resina de la siguiente manera:

Las muestras de raíz se cubrieron con una solución de etanol al 70% y 30% de 7100 Technovit® resina epoxi y se dejaron en vacío por espacio de 24 horas, luego se decantó la solución.

En solución de etanol al 50 % y 50 % de 7100 Technovit® por 24 horas al vacío y se decantó la solución.

En solución de etanol al 30 % y 70 % de 7100 Technovit® por 24 horas al vacío y se decantó la solución.

En solución de etanol al 10 % y 90 % de 7100 Technovit® por 24 horas al vacío y se decantó la solución.

En solución al 100 % de 7100 Technovit® por 24 horas al vacío.

#### **5.7.3.2 Infiltración**

La solución de infiltración se preparó con 100 mL de Technovit H7100® que contenían el catalizador XCL y se agregó el endurecedor I en agitación constante, después se agregó el endurecedor II y se continuó la agitación hasta disolución total. Después, las muestras de raíz se colocaron en cápsulas de gelatina transparentes y se cubrieron con la solución de infiltración.

#### **5.7.3.3 Polimerización**

Las cápsulas con las muestras de tejido infiltrado se dejaron reposar por 24 horas en vacío a temperatura ambiente, con el fin de asegurar la infiltración y el endurecimiento de las muestras. Transcurrido este tiempo las muestras de tejido inmersas en la cápsula de gelatina estuvieron listas para su orientación y corte.

#### **5.7.3.4 Orientación y corte de la muestra**

Las cápsulas con el tejido incluido ya endurecidas se pegaron con adhesivo en pequeños soportes de madera de 3x1x1 cm, de tal manera que la radícula de las plántulas quedó orientada perpendicularmente hacia la navaja de tungsteno del micrótopo rotatorio donde se realizaron los cortes seriados.

Los cortes se realizaron a 3 µm de espesor, los cuales se montaron en un portaobjetos para su posterior observación.

#### **5.7.3.5 Descripción anatómica del ápice de la raíz**

Los cortes montados en los portaobjetos se tiñen con el colorante azul de toluidina en solución acuosa al 2 %. El análisis de los cortes se realizó en un microscopio óptico de campo claro Zeiss® IMAGER M2, equipado con una cámara Axio Cam MRC y un módulo Apo Tome 2. Para la captura de las imágenes se empleó un objetivo de 100x y el software ZEN pro® 2012.

### **5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Las variables de germinación se analizaron con el programa GerminaQuant®, empleando un ANOVA factorial, teniendo como factores la variedad (2 niveles), la salinidad (4 niveles) y el OG (8 niveles).

El desarrollo de las plántulas se analizó con el Software XLStat®, de MicroSoft® mediante un ANOVA multifactorial para cada variable de respuesta, teniendo como factores la variedad (2 niveles), la salinidad (4 niveles) y el OG (8 niveles).

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE ÓXIDO DE GRAFENO**

#### **6.1.1 Tamaño de partícula**

La distribución de tamaño de partícula de OG determinado en esta investigación mostró que las partículas poseen un tamaño comprendido entre los 409 y los 818 nm, en diferentes porcentajes, obteniéndose un tamaño promedio de 632 nm (Figura 7). Si bien estos son los datos registrados por el equipo, no se debe descartar la posibilidad de la presencia de partículas tanto mayores como menores a estas mediciones. Dados los efectos sobre las propiedades fisicoquímicas, la distribución del tamaño es crítica para determinar la farmacocinética y toxicidad del

grafeno (Hu & Zhou, 2013). En las células vegetales, la pared celular actúa como una barrera que dificulta el acceso a cualquier agente externo, incluidos los NM (Chichiriccò & Poma, 2015).

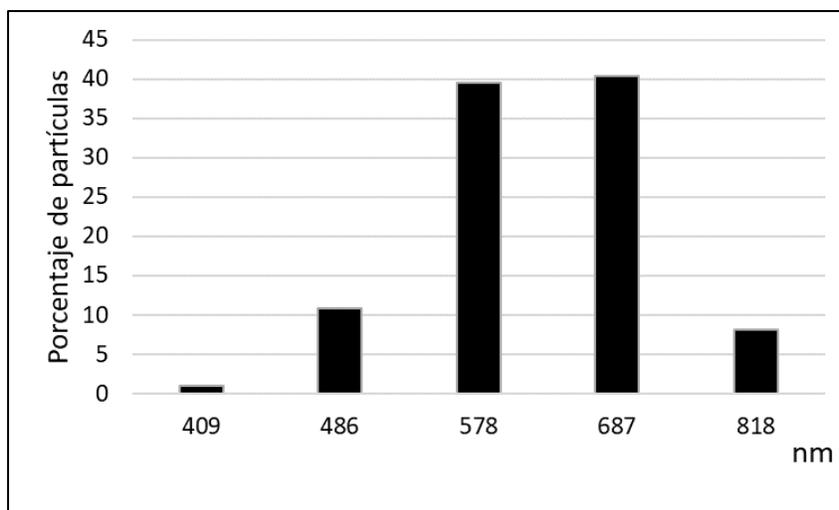


Figura 7. Distribución de tamaño de partícula

Las propiedades de tamizado de la pared celular están determinadas por el diámetro de los poros, que oscila entre 5 y 20 nm (Lin *et al.*, 2009), por lo que se estima que solo los agregados de NM con dimensiones menores al diámetro de los poros podrían pasar fácilmente y llegar a la membrana plasmática (Zhang *et al.*, 2008).

En la Figura 8 se presenta el esquema general de un canal iónico. Estos transportadores se encuentran insertados en la membrana celular, y pueden ser específicos o no específicos. Se ha reportado que, en el caso de NM metálicos, debido a su muy pequeño tamaño, estos NM pueden ingresar al interior de la célula mediante los canales iónicos específicos, como es el caso de NM de hierro (Lin *et al.*, 2010).

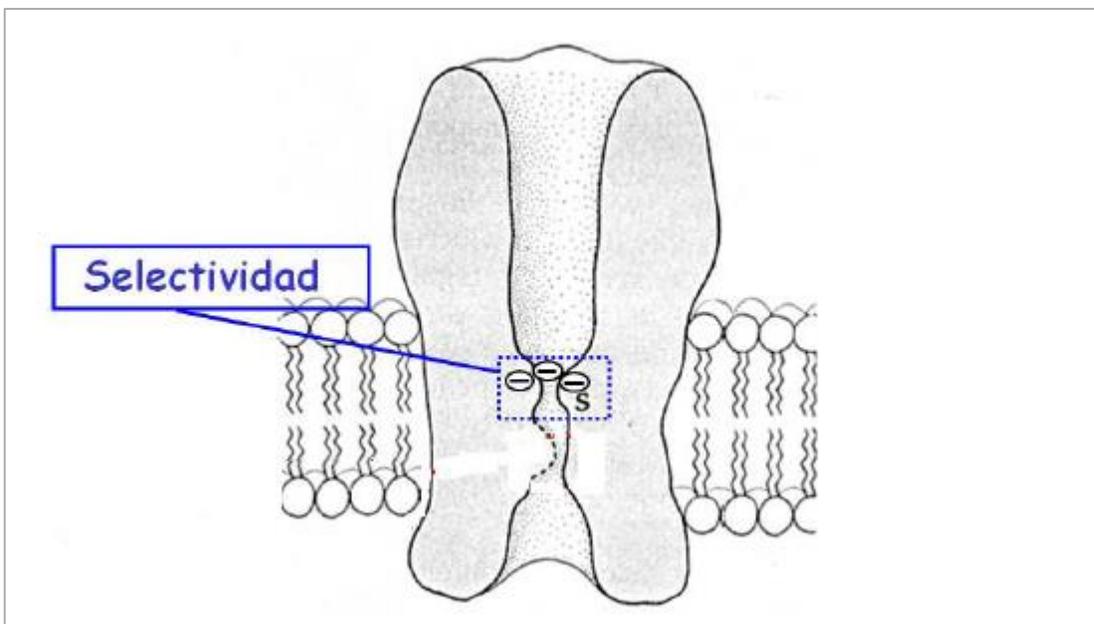


FIGURA 8. Esquema general de un canal iónico (Hedrich, 2012)

Con base en los reportes bibliográficos y con el tamaño de partícula determinado en este experimento, el OG no debería ser absorbido por la raíz, aunque debe considerarse que la determinación del tamaño de partícula se realizó con el reactivo puro. Sin embargo, debido a la reactividad inherente al OG, este NM si interaccionaría con la epidermis del tejido radicular, la cual posee también grupos funcionales activos.

### 6.1.2 Distribución de pKa para OG

La distribución de pKa para el OG se realizó a dos diferentes fuerzas iónicas, las cuales fueron 10 y 90 mM de NaCl. Se realizó de esta manera con el propósito de analizar posibles diferencias en la cantidad de grupos funcionales con capacidad reactiva en las diferentes condiciones de experimentación. Se encontró que, al aumentar la fuerza iónica del electrolito de soporte, los pKa de los grupos funcionales presentaron un desplazamiento de aproximadamente una unidad de pH, lo cual indica una modificación de la carga superficial en el OG. Además, se observó un cambio en el f(pKa) de los diferentes grupos detectados. Para los grupos carboxílicos hubo una disminución de 0.5 mmol/g, en los grupos lactónicos se observó un aumento de 0.8 mmol/g, para los grupos fenólicos se observó una disminución de 1.9 mmol/g y para los grupos carbonilos se observó un aumento de 1.7 mmol/g (Tabla 3).

Estos cambios están relacionados con la presencia de un exceso de iones  $\text{Na}^+$ , los cuales interaccionan con los grupos funcionales del OG y modifican su accesibilidad (Chowdhury *et al.*, 2015). Además, es importante señalar que, aunque la

determinación nos proporciona datos generales sobre los diferentes grupos funcionales presentes, no es posible atribuir el total de cada cuantificación a cada grupo de manera específica, sino que dentro cada rango de pH, se encuentran tanto grupos atribuibles a este rango por referencia de literatura, como grupos que, por su accesibilidad en estas condiciones de experimentación, presentaron actividad en este rango de pH. Debido a que los experimentos se llevaron a cabo a pH cercano a la neutralidad, los grupos que influyen en la actividad química del OG son principalmente los que se encontraron en el rango de los carboxílicos y los lactónicos.

Tabla 3. Distribución de pKa para OG a dos diferentes fuerzas iónicas.

NaCl	pH 3 -6 Carboxilos	pH 6-8 Lactónicos	pH 8-11 Fenólicos	pH ≥11 Carbonilos	% total
10 mM	15.81	9.72	40.08	32.73	98.34
90 mM	9.55	27.37	17.95	45.14	100,00

### 6.1.3 Cuantificación de grupos funcionales

La cuantificación de grupos funcionales por el método de Boehm determinó la siguiente composición del OG (Tabla 4).

Tabla 4. Cuantificación de grupos funcionales del OG

Cuantificación de grupos funcionales (meq/g)				total
Carboxilos	Lactónicos	Fenólicos	Carbonilos	
1.78	1.46	0.43	1.32	4.99

La cantidad de grupos funcionales presentes determina la capacidad del OG para reaccionar con otros componentes del sistema experimental, como la epidermis de la raíz y el NaCl. En un estudio se encontró que la funcionalización de NM de carbono ocasionó una notable disminución de los efectos tóxicos (Rico *et al.*, 2011). Por lo tanto, es posible que en el caso del OG, al aumentar la salinidad del medio, disminuya su toxicidad, pero al mismo tiempo, al aumentar la cantidad de grupos funcionales, aumenta su capacidad reactiva.

En las condiciones de experimentación, los grupos más relevantes son los carboxílicos y los fenólicos, ya que, al pH de trabajo, los grupos carboxílicos se encuentran disociados, por lo cual tienen una alta actividad química. Por otra parte, los grupos lactónicos se encontrarán parcialmente disociados, pero también aportan actividad reactiva. Es posible estimar que los grupos fenólicos y carbonilos no presentaron actividad química en estas condiciones de experimentación.

## 6.2 EVALUACIÓN DE GERMINACIÓN

### 6.2.1 Porcentaje de germinación

La germinación fue afectada por los factores NaCl, OG, la interacción NaCl\*OG y la interacción variedad\*NaCl\*OG (Tabla 5).

Tabla 5. Tabla de ANOVA con los resultados del porcentaje de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad en dos variedades de frijol.

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F	Pr > F
Modelo	63	3923,438	62.277	4.783	< 0.0001
Error	192	2500,000	13.021		
Total Corregido	255	6423,437			
Variedad	1	1,563	1.563	0.0120	0.729
NaCl	4	153,348	38.337	2.944	0.022
OG	7	1071,726	153.104	11.758	< 0.0001
Variedad*NaCl	4	52,455	13.114	1.007	0.405
Variedad*OG	7	185,119	26.446	2.031	0.053
NaCl*OG	20	1548,363	77.418	5.946	< 0.0001
Variedad*NaCl*OG	20	910,863	45.543	3.498	< 0.0001

Los resultados de la Tabla 5 también nos permiten ver que, aunque los factores NaCl y OG influyen en la respuesta, es más significativa la presencia de OG. Esto puede deberse a que el estrés salino es un factor abiótico que ha estado presente en la evolución de las especies vegetales a lo largo de la vida del planeta y las plantas han podido desarrollar estrategias para enfrentarlo, mientras que los NM en general, son recientes y las plantas no han desarrollado aun estrategias para mitigar su presencia (Pareek *et al.*, 2010). Otros factores que influyen en la respuesta son las interacciones NaCl\*OG (lo cual indica que la presencia de NaCl influye sobre el efecto que a su vez tiene el OG) y variedad\*NaCl\*OG (lo cual indica que la variedad también influye en los efectos que provocan el NaCl y el OG). Las interacciones variedad\*NaCl y variedad\*OG no son significativas.

Para la variedad Bayo se encontró una disminución de la germinación en los tratamientos de 1000 ppm de OG, así como a 90 mM y 1500 ppm de OG (Figura 9). Para la variedad Flor de mayo, se registró una menor germinación en los tratamientos de 30 mM y 1500 ppm de OG, así como en 90 mM y 1500 ppm de OG (Figura 10).

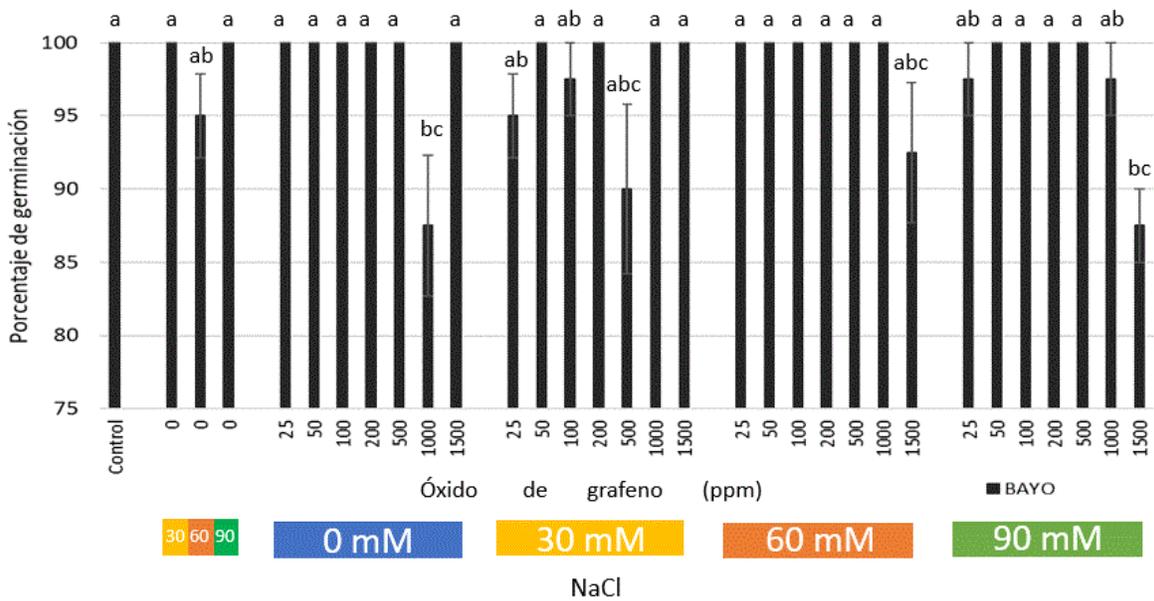


Figura 9. Porcentaje de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Bayo.

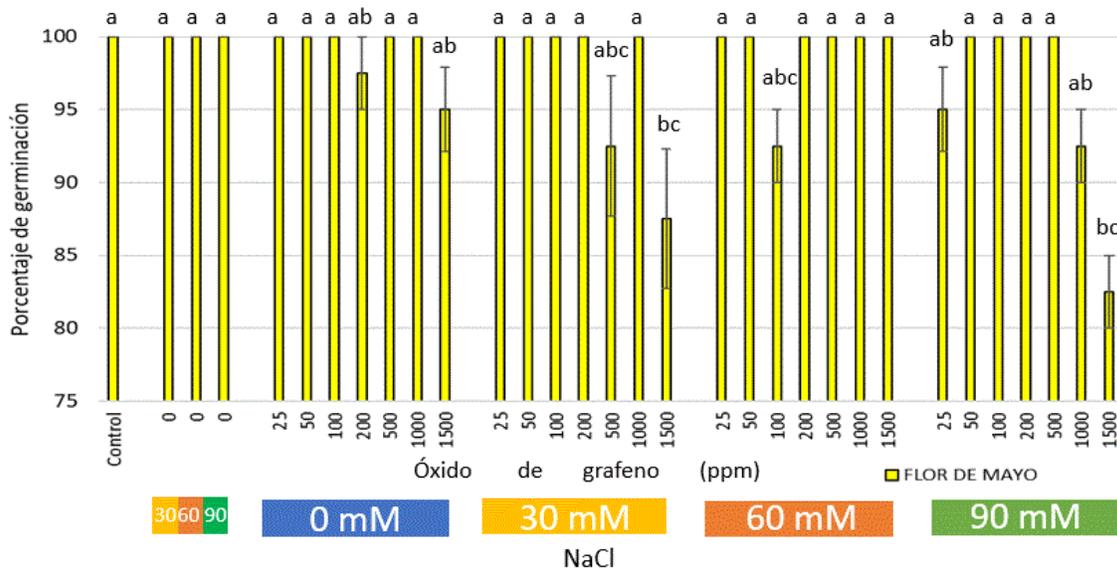


Figura 10. Porcentaje de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Flor de mayo.

La disminución en el porcentaje de germinación puede atribuirse principalmente a una reducción en el potencial hídrico del medio de cultivo, el cual es generado por las concentraciones de NaCl y OG presentes; las altas concentraciones tanto de NaCl como de OG disminuyen el agua disponible para la imbibición de las semillas.

La reducción del potencial hídrico del medio se explica por el hecho de que, tanto las moléculas de NaCl como de OG requieren de moléculas de agua para ser solvatadas. En el caso del NaCl, se trata de una sal altamente higroscópica, por lo cual, al encontrarse en un medio acuoso, se separa en sus componentes  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , los cuales retienen moléculas de agua a su alrededor, disminuyendo con esto la cantidad de agua disponible para la imbibición de las semillas. En el caso del OG, las moléculas requieren también moléculas de agua para su solvatación, pero, además, los grupos funcionales disociados en las condiciones de experimentación (carboxílicos y lactónicos), requieren cargas positivas para estabilizar los grupos oxigenados disociados, encontrando estas cargas en las moléculas de agua, las cuales son polares. Por lo tanto, el OG, al requerir moléculas de agua para estos procesos, también disminuye la cantidad de agua disponible en el medio. En síntesis, la presencia de NaCl y/o OG disminuye la cantidad de agua disponible para la imbibición de las semillas; aunque el agua se encuentra presente, disminuye su disponibilidad conforme aumenta la concentración de los factores de estrés abiótico (Chulim *et al.*, 2014).

Los resultados muestran que, aun con la presencia de un alto nivel de salinidad, el porcentaje de germinación no se ve afectado de manera significativa para ambas variedades. Aunque se observa una tendencia de una disminución en el porcentaje de germinación al aumentar la concentración de los factores de estrés abiótico, esta disminución solo resulta significativa en los casos anteriormente mencionados. Esto nos indica que, tanto la variedad Bayo como la variedad Flor de mayo son capaces de realizar los ajustes osmóticos necesarios para contrarrestar el bajo potencial hídrico que ocasiona un alto nivel de salinidad (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2012). Se ha demostrado que a mayor concentración de sales más se reduce el potencial osmótico e hídrico y eso obliga a las semillas a realizar procesos de ajustes osmóticos para poder superar el potencial del medio en el que se encuentran inmersas y poder germinar, de lo contrario, si la semilla no logra superar el estrés del medio, se deshidratará (Kaymakanova, 2009).

Los resultados de esta investigación muestran que al incrementarse la concentración de NaCl, la variedad Bayo presenta a 60 mM una disminución en el porcentaje de germinación y, aunque esta no es significativa, si proporciona un indicio de que esta variedad presenta algún grado de sensibilidad a este tipo de estrés abiótico. Por otra parte, la variedad Flor de mayo no presenta ninguna diferencia en los diferentes tratamientos de salinidad, lo cual proporciona indicios de que se trata de una variedad resistente a este tipo de estrés. La existencia de variedades sensibles y tolerantes a la salinidad se ha reportado anteriormente (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2002; Cokkizgin, 2012; Chulim *et al.*, 2014).

La disminución del porcentaje de germinación en un elevado estrés, comprueba la hipótesis de esta investigación.

Los resultados correspondientes a las variables tiempo medio de germinación, tasa media de germinación e índice de sincronización presentaron resultados similares. Estos resultados se describen en el Anexo I.

## 6.3 DESARROLLO DE PLÁNTULAS

### 6.3.1 Longitud de tallo

Los resultados del análisis estadístico muestran que la longitud del tallo es afectada por todos los factores y combinaciones de los mismos (Tabla 6).

Tabla 6. Tabla de ANOVA con los resultados de longitud de tallo para los diferentes tratamientos de salinidad en dos variedades de frijol.

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F	Pr > F
Modelo	63	493.477	7.833	77.135	< 0,0001
Error	192	19.497	0.102		
Total Corregido	255	512.975			
variedad	2	127.467	63.734	627.619	< 0.0001
NaCl	4	207.633	51.908	51.168	< 0.0001
OG	7	27.303	3.900	38.410	< 0.0001
variedad*NaCl	6	7.602	1.267	12.478	< 0.0001
variedad*OG	12	86.729	7.227	71.172	< 0.0001
NaCl*OG	20	29.198	1.460	14.376	< 0.0001
variedad*NaCl*OG	12	7.545	0.629	6.191	< 0.0001

El análisis de las variedades de forma independiente, mostró que, para la variedad Bayo, se encontraron diferencias significativas en todos los tratamientos respecto al control (excepto en el tratamiento de 25 ppm de OG); estas diferencias representan una disminución de la longitud del tallo (Figura 11).

En el caso de la variedad Flor de mayo, en todos los tratamientos se presentaron diferencias significativas, y en todos representan también una disminución de la longitud del tallo respecto del control (Figura 12). Cabe destacar que los resultados mostrados en las dos figuras anteriores fueron analizados para ambas variedades juntas, pero se presentan por separado para que se aprecien mejor las diferencias dentro de cada variedad.

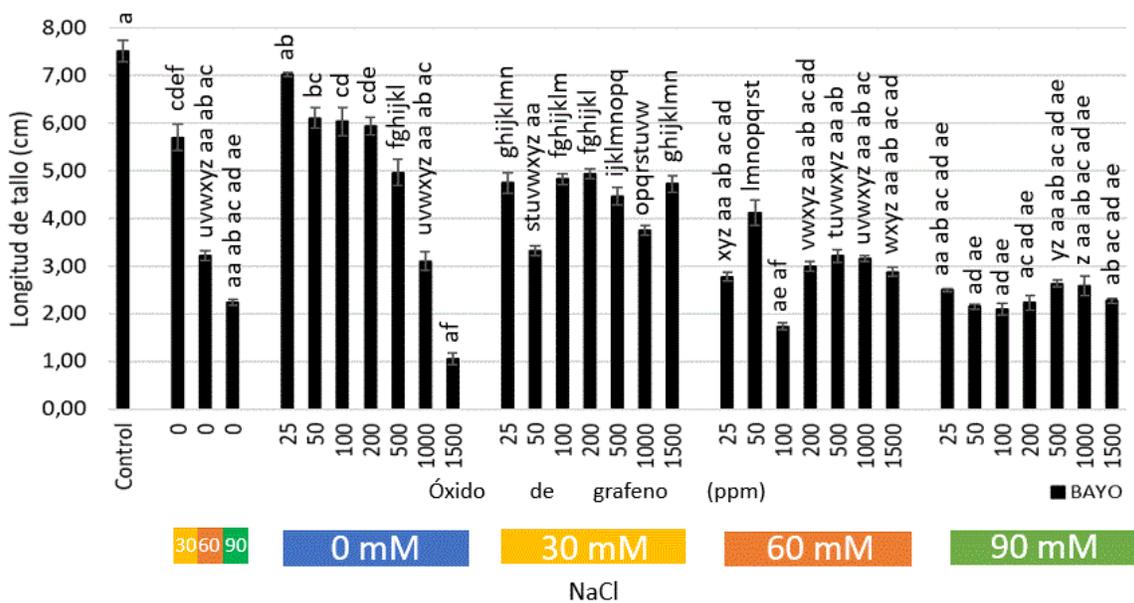


Figura 11. Longitud de tallo para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Bayo.

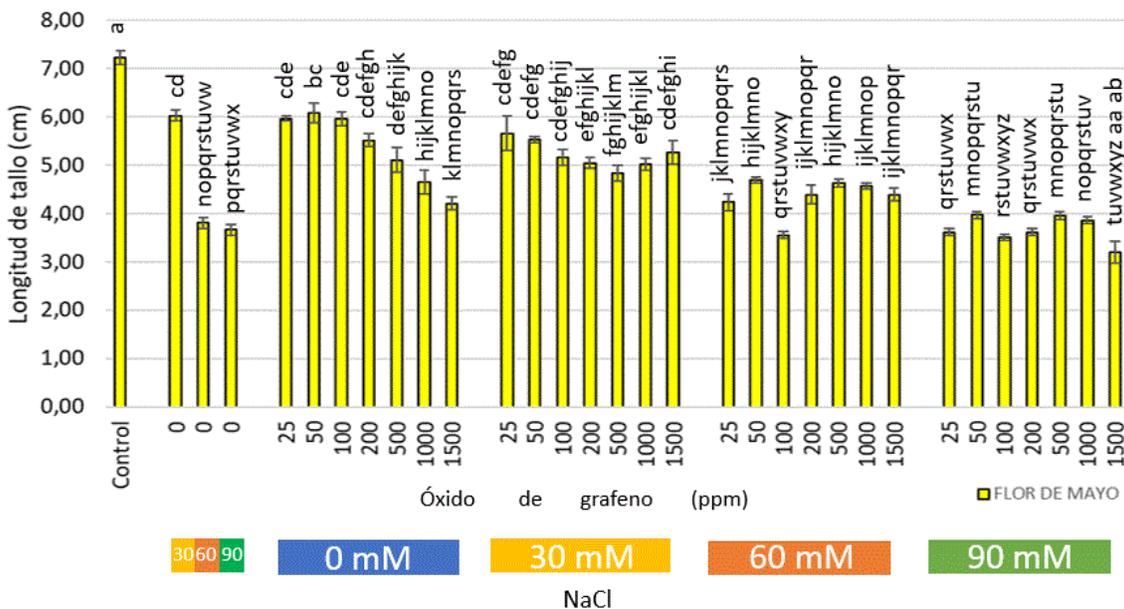


Figura 12. Longitud de tallo para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Flor de mayo.

La interacción variedad\*salinidad fue significativa, encontrándose que al aumentar el estrés salino disminuyó la longitud del tallo en las dos variedades y en todos los tratamientos (30, 60 y 90 mM). En el caso de la variedad Bayo, los tratamientos 30, 60 y 90 mM generaron una reducción de la longitud del tallo de 24, 58 y 66 %

respectivamente. Para el caso de la variedad Flor de mayo, estas cifras son 16, 46 y 49 %. Los resultados muestran que la variedad Flor de mayo es más resistente a la salinidad que la variedad Bayo.

Cuando se compararon las dos variedades en un mismo tratamiento, se presentaron diferencias en los tratamientos: 30 mM de NaCl con 50 ppm de OG, 30 mM de NaCl con 1500 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 25 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 100 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 200 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 500 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 1000 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 1500 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 25 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 50 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 100 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 200 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 500 ppm de OG y 90 mM de NaCl con 1000 ppm de OG. Estas comparaciones mostraron que, si bien en ambas variedades se presentó una disminución de la longitud del tallo respecto del control, la disminución en la variedad Bayo es más evidente.

Como se ilustra en la Figura 13, existen diversos antecedentes sobre los efectos de la salinidad en *Phaseolus vulgaris*. En el caso de las variedades sensibles a salinidad, lo que se ha encontrado es que un exceso de NaCl en el medio de cultivo provoca que la raíz absorba las formas iónicas  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . El  $\text{Cl}^-$  se absorbe por difusión pasiva y puede reasignarse a toda la planta, mientras que el  $\text{Na}^+$  se absorbe y se retiene mayormente en la raíz, ya que no es reasignado al resto de la planta. El  $\text{Na}^+$  es absorbido primeramente de manera pasiva, es decir, existen canales que lo transportan al interior de la raíz por gradiente de concentración, aunque también existen canales en el sentido inverso, los cuales expulsan  $\text{Na}^+$  desde el interior de la raíz. Cuando se presentan condiciones de salinidad, se aumenta la absorción por la raíz, lo cual provoca un exceso de este ion en el citosol, lo cual a su vez provoca toxicidad al interior de la célula. Otro efecto que se presenta es que, al absorberse un exceso de  $\text{Na}^+$ , este compite con los sitios de unión del  $\text{K}^+$ , lo cual provoca que este último sea desplazado fuera del tejido. El  $\text{K}^+$  es un cofactor en muchas enzimas vegetales que intervienen en el desarrollo de las plantas, en la síntesis de ATP y en la regulación de la absorción de agua, por lo que su pérdida ocasiona un decremento en el desarrollo. Otro efecto generado por el exceso de  $\text{Na}^+$ , es que compite también por los sitios de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana celular, al cual también desplaza. El  $\text{Ca}^{2+}$  interviene en la formación del pectato de calcio, el cual es un compuesto fundamental en la estructura vegetal. En conjunto, las deficiencias y alteraciones metabólicas causadas por el exceso de  $\text{Na}^+$  provocan una disminución o inhibición del desarrollo, no solo del tallo, sino de todas las estructuras de la planta. Este proceso explica el menor desarrollo de la variedad Bayo, a la cual



partir de 500 ppm, si existió un importante decremento en este parámetro. Para la variedad Bayo, las diferencias fueron a 500 ppm una reducción de 34%, a 1000 de 58% ppm y a 1500 ppm de 85%. Para la variedad Flor de mayo, la reducción fue de 29, 36 y 41% respectivamente.

A nivel macroscópico, se puede observar cómo las raíces de las plántulas cultivadas en estos tratamientos se cubren de una capa de OG. Se sugiere que el OG puede adherirse a la pared celular mediante enlace puente de hidrógeno y por interacciones  $\pi$ - $\pi$  que generan un fuerte anclaje. Se sabe que estos dos tipos de interacciones son capaces de degradar la estructura secundaria de los péptidos de la membrana celular. Aunado a esto, el OG tiene una alta afinidad por los grupos hidroxilo que se encuentran en la superficie de la epidermis de la raíz (Golkaram & Van Duin, 2015) (Figura 14). Estas interacciones propician que la epidermis de la raíz sea recubierta de OG, lo que a su vez genera un efecto de bloqueo sobre la fluidez de la membrana, impidiendo el paso de cualquier otro componente del sistema experimental y bloqueando incluso el paso del agua, lo que provoca la drástica disminución del desarrollo de la planta.

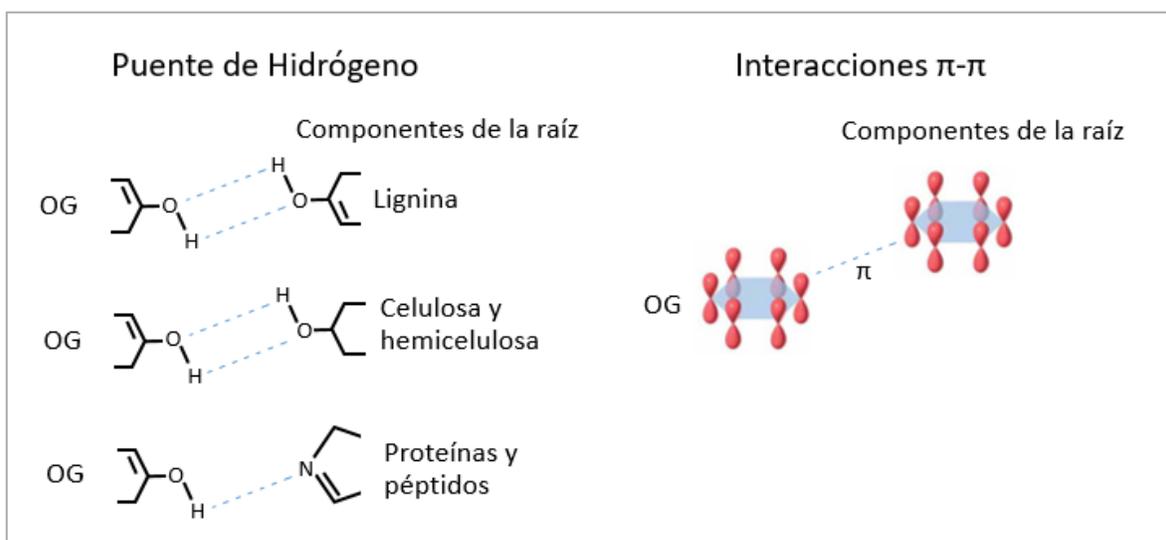


Figura 14. Interacciones entre el OG y los componentes de la epidermis de la raíz de *Phaseolus vulgaris*.

En los tratamientos de combinación de 30 mM de NaCl y OG, cuando se compararon las variedades de manera independiente, para la variedad Bayo, con excepción de la concentración de 25 ppm de OG, se observaron diferencias en todos los tratamientos, siendo estas diferencias una reducción en la longitud del tallo; la mayor diferencia es una reducción de 36% (50 ppm). En el caso de la variedad Flor de mayo, se encontraron diferencias en todos los tratamientos, presentando una reducción máxima de la longitud del tallo de 18% (500 ppm). Los resultados muestran que, al igual que en las variables de respuesta anteriores, la variedad Flor de mayo presenta mayor tolerancia al estrés abiótico.

En la combinación de 60 mM de NaCl y OG, al comparar las variedades de manera independiente, la variedad Bayo presentó menor longitud de tallo en todos los tratamientos, con la mayor reducción a 100 ppm (74.66%). Para la variedad Flor de mayo, se encontraron diferencias también en todas las concentraciones, presentándose la mayor reducción (45.83%) a 100 ppm.

Para los tratamientos de 90 mM de NaCl y OG, los resultados muestran que, al presentarse esta combinación de estrés, existe una importante reducción en la longitud del tallo. Cuando se compararon las variedades en los mismos tratamientos, en todos los casos la reducción fue mayor para la variedad Bayo. Cuando se compararon las variedades de forma independiente, para la variedad Bayo hubo reducción de 70% aproximadamente en longitud de tallo en todos los casos. De igual manera, para la variedad Flor de mayo, también se observó una reducción en la longitud del tallo, siendo ésta de 48% aproximadamente.

Se ha reportado que el estrés salino provoca la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana celular y, por otra parte, se ha descrito que los cationes divalentes forman complejos muy estables con las láminas de OG, lo que disminuye de manera muy importante su estabilidad en agua (Chowdhury *et al.*, 2015) (Figura 15).

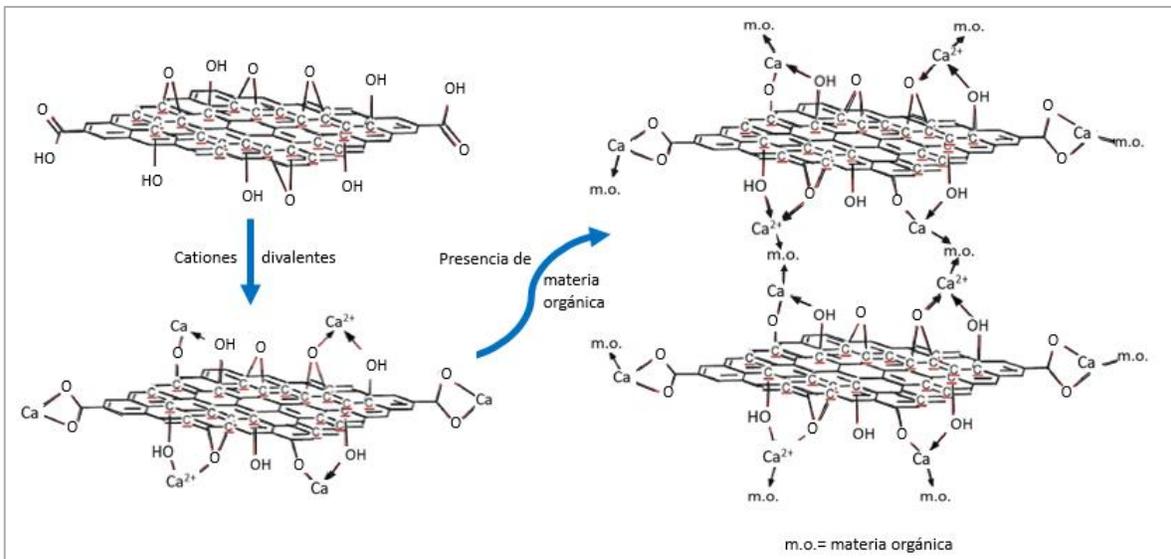


Figura 15. Interacción entre el OG, cationes divalentes y materia orgánica (modificado de Chowdhury *et al.*, 2015).

En cuanto al desarrollo de las plántulas en condiciones de salinidad, en general se observó que al aumentar la concentración de NaCl, disminuyó la longitud de tallo, lo cual coincide con resultados ya reportados en otros estudios (Gama *et al.*, 2007; Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2012). El desarrollo del tallo fue afectado por los factores de estrés abiótico de forma independiente; en el caso de la salinidad se encontró disminución en el desarrollo del tallo en las dos variedades. En el caso del OG, la afectación ocurre en las dos variedades, aunque es más evidente para la variedad Bayo. Cuando se analizaron los dos factores de estrés abiótico en combinación, hubo disminución respecto del control en todos los casos, y con una tendencia de reducción en la longitud de tallo al aumentar el estrés de los tratamientos.

Se observó también que, al aumentar la concentración de NaCl, el OG deja de tener efecto sobre los parámetros de desarrollo. Esto se debe a que la alta concentración de NaCl provocó la coagulación y subsecuente floculación de las láminas de OG, lo cual a su vez ocasionó que se modificara su tamaño, carga superficial, así como accesibilidad y disponibilidad de los grupos funcionales. En cuanto al tamaño, es conveniente recordar que el OG es una estructura de 1 átomo de carbono de grosor, con una longitud promedio de 632 nm; la floculación de las láminas de OG provocó que estas se aglomerasen y que aumentaran su grosor. Aunado a esto, los grupos carboxílicos y lactónicos que estaban disociados (con carga negativa), reaccionaron con los iones Na<sup>+</sup>, debido a lo cual esos grupos funcionales ya no estaban disponibles, modificando al mismo tiempo la carga superficial del OG. Además, la

generación de flóculos provocó, al perder el OG la forma de lámina, una disminución en la accesibilidad de los grupos funcionales. Debido a lo anterior, se explica que, en los tratamientos que combinaron ambos factores de estrés abiótico, al aumentar la salinidad, el OG perdiera efecto inhibitorio sobre el desarrollo de las plántulas (Chowdhury *et al.*, 2015; Rogala *et al.*, 2016).

Los resultados correspondientes a las variables biomasa subterránea, biomasa total y relación brote:raíz, se describen en el anexo II, debido a que muestran resultados similares al desarrollo de tallo.

### **6.3.7 Variación de pH de la solución de estudio en la unidad experimental**

Se midió el pH de tratamientos seleccionados a los 5 y 10 días de cultivo en ambas variedades. Este análisis se realizó con el propósito de evaluar si, en caso de existir variaciones importantes en esta variable, esto pudiera influir en el comportamiento de los grupos funcionales presentes tanto en el OG como en la epidermis de la raíz. Se partió del valor de pH de las soluciones preparadas para cada tratamiento, las cuales fueron ajustadas a  $\text{pH } 7.0 \pm 0.3$ .

Como se comentó en secciones anteriores, al pH de trabajo inicial, tanto en el OG como en la epidermis de la raíz, los grupos funcionales disociados corresponden a grupos que pueden atribuirse, al menos en parte, a grupos carboxílicos y lactónicos.

Las mediciones se realizaron a los 5 y 10 días de tratamiento debido a que, por el procedimiento de cultivo empleado, en el cual se agregó 1 mL de solución de tratamiento a la unidad experimental, en los primeros 4 días de tratamiento no fue posible recuperar solución suficiente para realizar la medición. Además, la manipulación de esta solución experimental provocó también contaminación en algunas unidades experimentales, por lo que se decidió realizar mediciones solo a los 5 (mitad del tratamiento) y 10 días (final del experimento).

Para la variedad Bayo, se registró una disminución máxima de 0.3 unidades de pH a los 5 días de desarrollo en el tratamiento de 90 mM de NaCl y 1500 ppm de OG; a los 10 días la máxima variación del pH se presentó en el tratamiento de 500 ppm de OG, con una disminución de 0.3 unidades de pH (Figura 16). Los resultados mostraron que, debido al intervalo de pH en el que existieron variaciones, no se espera que grupos funcionales con un pKa distinto a los ya mencionados tengan actividad química.

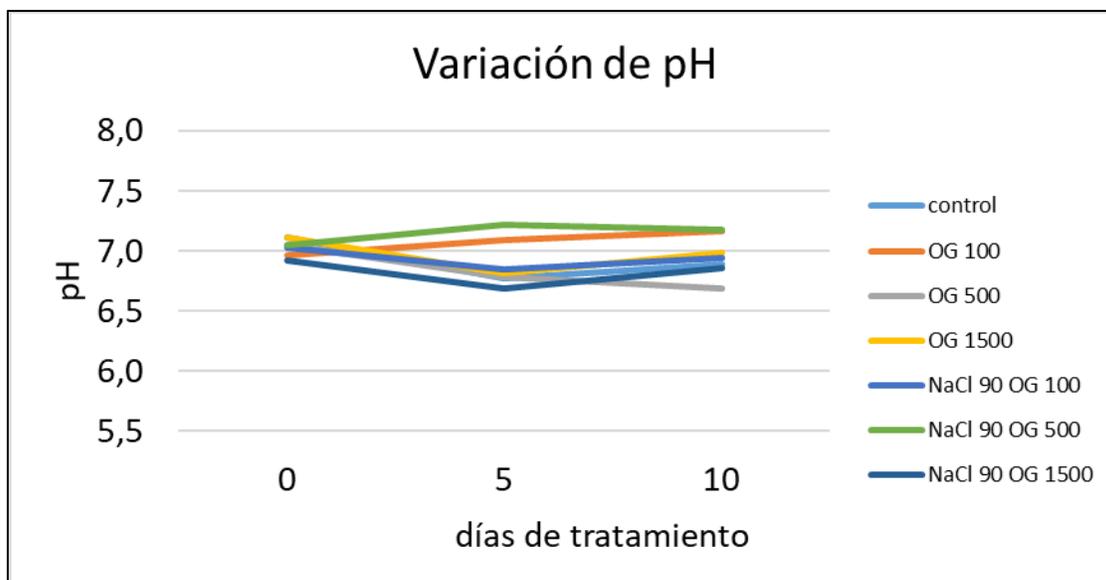


Figura 16. Variación de pH en tratamientos seleccionados de variedad Bayo.

Como se observa en la Figura 17, para la variedad Flor de mayo, a los 5 días se presentó una mayor disminución en el pH en los diferentes casos, con un máximo de 1.2 unidades en los tratamientos de OG 500 y 1500 ppm. A los 10 días de tratamiento, se observó una tendencia de aumento del pH en los tratamientos, teniendo la mayor variación final el tratamiento de OG 1500 ppm, con 0.35 unidades de pH. Además, a los 5 días en la mayoría de los tratamientos el pH disminuye cerca o por debajo de 6.0, por lo que se puede esperar que los grupos lactónicos tanto en el OG como en la epidermis de la raíz, queden protonados y, por lo tanto, no participen en los mecanismos de reacción. También se pudo observar que, a los 10 días de tratamiento, el pH regresó a un valor muy similar al inicial. Solo en el caso del tratamiento de 100 ppm de OG, el pH llegó a 7.8, por lo que, en este caso, es factible que los grupos carboxílicos, lactónicos, péptidos con grupos tiol y amino ácidos en general aumenten su actividad química (Baldwin *et al.*, 2003; Bresinsky *et al.*, 2013).

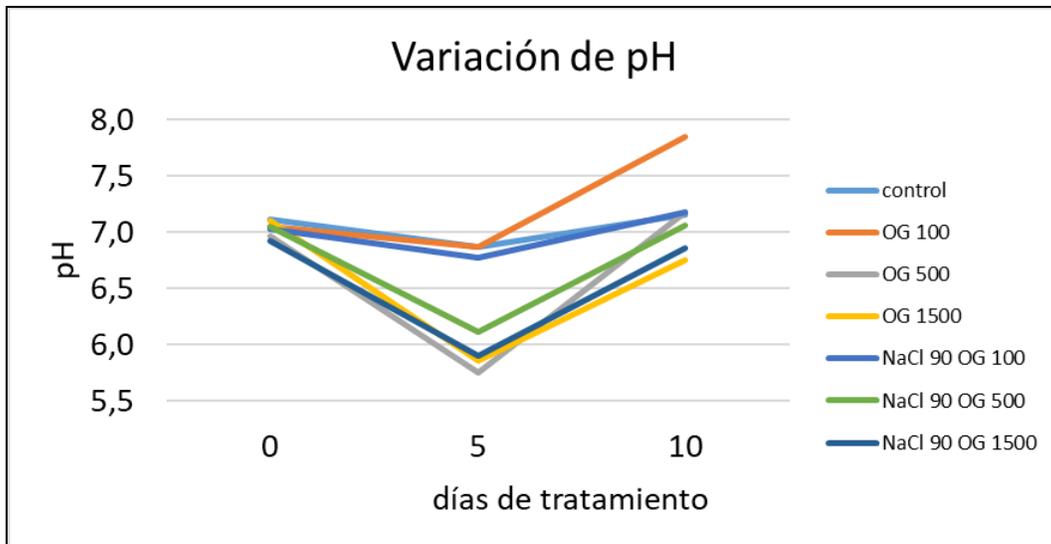


Figura 17. Variación de pH en tratamientos seleccionados de variedad Flor de mayo.

Al comparar el comportamiento de las dos variedades y de acuerdo a los mecanismos de resistencia mencionados anteriormente, podemos atribuir el comportamiento de la variedad Bayo al hecho de que en esta variedad ocurre el intercambio de cationes, ingresando  $\text{Na}^+$  y expulsando  $\text{K}^+$  en la raíz, lo cual no altera significativamente el pH. Por el contrario, en la variedad Flor de mayo, al ser una variedad tolerante a salinidad, está presente el antitransportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , por lo que la expulsión de protones al medio de cultivo explicaría la disminución en el pH. La recuperación del pH al final del experimento, puede explicarse por el hecho de que el estrés hídrico de la plántula favorece la entrada de agua y de los solutos que contenga, lo cual permite el reingreso de los protones al interior del tejido (Huertas *et al.*, 2013).

Además, aunado a estos procesos, debe considerarse la presencia de OG, debido a que en los tratamientos se parte de soluciones de OG y de NaCl con OG. En el caso de la variedad Bayo, puede estimarse que, al presentarse el intercambio de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , no se presentó una modificación importante del comportamiento del OG. En cambio, en la variedad Flor de mayo, al liberarse  $\text{H}^+$  al medio, éstos reemplazan los iones  $\text{Na}^+$  de los grupos oxigenados del OG, reduciendo la reactividad química de éste, protonando al menos en parte a los grupos carboxílicos (y los grupos con comportamiento semejante a éstos), por lo que los grupos que presentarían actividad química serían los lactónicos. Esto ocurre porque los primeros presentan un pKa de 3 a 6, mientras los segundos lo presentan de 6 a 8; por lo tanto, al ser los grupos carboxílicos ácidos más fuertes que los lactónicos, los primeros presentan mayor afinidad por los  $\text{H}^+$ .

### 6.3.8 Cuantificación de grupos funcionales en epidermis de raíz

Esta determinación se realizó con la finalidad de conocer la composición superficial de la raíz en ambas variedades, debido a que la presencia y proporción de grupos funcionales en la epidermis es determinante en su actividad química. Además, con el propósito de explicar las diferencias entre variedades en el desarrollo de las plántulas, se valoraron muestras de raíz cultivadas en el tratamiento control y el tratamiento de 90 mM de NaCl (muestra salina), y se emplearon también dos concentraciones de electrolito de soporte, 10 mM y 90 mM de NaCl.

Además de los grupos oxigenados que están asociados a los materiales de carbono, la cuantificación de grupos funcionales en epidermis de raíz incluye los componentes de la pared celular, dentro de los cuales se cuentan la pectina (pKa 3.5), lignocelulosa (pKa 9-12), grupos amino de péptidos y proteínas como son: grupos amino con sustituyente de cadena aromática (pKa 3-5), grupos amino con sustituyente de cadena alifática (pKa 10-11), aminas secundarias (como las presentes en la extensina, una proteína constituyente de la pared celular, pKa 11), aminas terciarias (pKa 10-11) y grupos tiol (pKa 6-8). También debe considerarse la cuantificación de exudados de la raíz, como son el malato (pKa 3.4 y 4.3) y citrato (pKa 3.15, 4.77 y 6.40) (Taiz & Zeiger, 2002; Azcón-Bieto & Talón, 2003; Baldwin *et al.*, 2003; Bresinsky *et al.*, 2013).

Primeramente, para la variedad Bayo, cuando se compararon las muestras control de esta variedad, al aumentar la concentración del electrolito de soporte de 10 a 90 mM, se observó que dejaron de cuantificarse grupos funcionales por encima de pH 11, al tiempo que aumentaron en esa misma proporción los grupos con pKa entre 8 y 11, como los fenólicos y aminas. Además, al aumentar la concentración del electrolito de soporte, se cuantificó un pequeño porcentaje de grupos funcionales con pKa comprendido entre 3 y 6 (Tabla 7).

En la cuantificación de la muestra cultivada con estrés salino titulada a baja salinidad se registraron grupos funcionales con pKa de 3 a 6, como los carboxílicos y la pectina, al tiempo que dejaron de registrarse los grupos con pKa entre 6 y 8, como los lactónicos y los grupos tiol; los grupos funcionales con pKa de 8 a 11 disminuyeron un 35%, mientras que en esta última proporción aumentaron los grupos carbonilo. En la muestra cultivada en estrés salino y titulada en alta salinidad, con respecto a la muestra control, podemos ver que en este caso disminuyeron los grupos con pKa comprendido entre 6 y 8 en un 10% y comprendidos entre 8 y 11 (como los fenólicos) en un 29%, a la vez que los grupos con pKa mayor a 11 (como los carbonilo y aminas) aumentaron un 42%. Debe hacerse notar que, al igual que se ha descrito en secciones anteriores, los grupos que presentan actividad química en las condiciones experimentales son los comprendidos en el rango de pKa de 6 a 8, como son los carboxílicos, los lactónicos y tioles.

En el caso de la variedad Flor de mayo, al comparar las muestras control, en el caso de la muestra titulada en estrés salino agudo con respecto del control, se presentó una disminución del 5% grupos con pKa entre 6 y 8 (por ejemplo, lactónicos), un aumento de grupos con pKa comprendido entre 8 y 11 de 8% y una disminución marginal de grupos con pKa de 11 o mayor de 2% (Tabla 7).

La cuantificación de la muestra cultivada en salinidad crónica presentó, con respecto de la muestra control, un aumento marginal de los grupos con pKa entre 3 y 6 de 1.3%, aumentaron los grupos con pKa de 8 a 11 (por ejemplo, fenólicos) en un 20% y disminución un 21% los grupos con pKa igual o mayor a 11, (por ejemplo, carbonilos y celulosa). La salinidad generó un cambio en la composición superficial de la epidermis de la raíz, marcadamente entre grupos funcionales con pKa igual o mayor a 8, como son los fenólicos, los carbonilos, aminos y carbohidratos, entre otros. Además, la salinidad debe influir en el grado de exposición que otros grupos puedan presentar, por ejemplo, la disminución en la cuantificación de los grupos con pKa mayor a 11, puede atribuirse a la disminución de la exposición de la extensina (proteína con una alta proporción de hidroxiprolina y pKa de 11), lo cual puede explicarse con la deshidratación en la epidermis provocada por la salinidad, la cual provoca la pérdida de la turgencia celular y por lo tanto la exposición de dicha proteína (Furtado Macedo, 2012).

Cuando comparamos los resultados de la muestra control con los otros tratamientos, vemos que, al aumentar la salinidad, aumentaron también los grupos fenólicos; mientras que para la muestra salina observamos que, al aumentar la fuerza iónica del electrolito de soporte, el mayor cambio ocurrió entre los grupos grupos funcionales con pKa igual o mayor a 8. Este cambio no puede atribuirse a la aparición o desaparición de los grupos como tal, sino más bien a la activación y/o desactivación de proteínas de superficie, como pueden ser canales iónicos y acuaporinas. Los primeros son más específicos, aunque pueden ser o no dependientes de la concentración de  $\text{Na}^+$  y del voltaje; las segundas son un grupo de proteínas con una diversidad de tamaños y funciones, las cuales tienen el propósito de favorecer la entrada de agua al tejido cuando el medio externo presenta un bajo potencial hídrico; sin embargo, no son selectivas solo a moléculas de agua, ya que permiten el paso de agua aunado a los solutos disueltos que contengan (Ulate Montero, 2013).

Otra estructura que debe tomarse en cuenta en la cuantificación de los grupos funcionales es la lignocelulosa, la cual aporta una gran cantidad de grupos OH, tanto en los fenoles de la lignina, como en las moléculas de glucosa que forman la celulosa y la hemicelulosa. En la Figura 18 se presenta un esquema de la epidermis de raíz, En amarillo se presenta la epidermis, en rojo la exodermis (con paredes celulares lignificadas) y el parénquima cortical en color azul. Es en la epidermis donde se localizan las moléculas anteriormente mencionadas como son los canales iónicos y acuaporinas, además de que es esta capa más externa la que resulta más afectada por el estrés salino, al ser la primera capa de células que entra en contacto con el estrés abiótico.

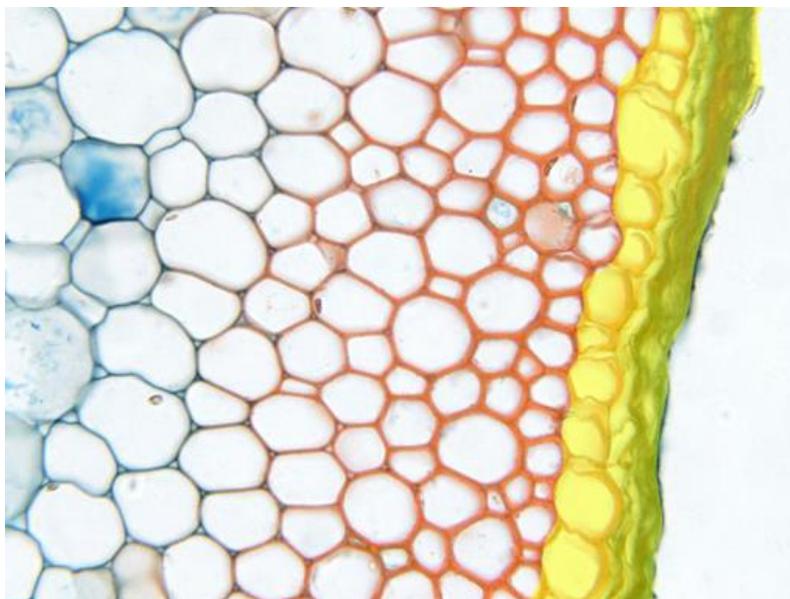


Figura 18. Diagrama de la estructura de la epidermis (Jos *et al.*, 2009)

Cuando se comparó la cuantificación de la muestra salina valorada a su vez en alta salinidad con respecto a la muestra salina valorada en 10 mM, los grupos con pKa entre 6 y 8 (como tioles y lactónicos) disminuyeron un 5%, los grupos con pKa entre 8 y 11 (como fenólicos y aminas) disminuyeron 13%, y los grupos con pKa igual o mayor a 11 (como carbonilos y proteínas) aumentaron un 20%. Con respecto de la muestra control, disminuyeron los grupos con pKa entre 6 y 8 en un 4%, aumentaron los grupos con pKa entre 8 y 11 un 5%, mientras que los grupos con pKa igual o mayor a 11 (por ejemplo, carbonilos) se mantuvieron en la misma proporción.

Tabla 7. Cuantificación de grupos funcionales en epidermis de raíz.

Variedad	Cultivo	NaCl	pH 3 -6	pH 6-8	pH 8-11	pH ≥11	% total
Posibles grupos asociados			Carboxilos pectina malato citrato aminas aromáticas	Lactónicos citrato	Fenólicos tioles polisacaridos aminas alifáticas aminas secundarias aminas terciarias	Carbonilos extensina polisacaridos	
bayo	control	10 mM	0.0	15.35	52.09	32.36	99.80
bayo	control	90 mM	1.49	18.03	80.43	0.0	99.95
bayo	salino	10 mM	6.07	0.0	15.71	77.99	99.77
bayo	salino	90 mM	0.0	5.20	20.89	73.69	99.78
flor de mayo	control	10 mM	0.0	13.74	27.44	58.73	99.91
flor de mayo	control	90 mM	0.0	8.65	35.13	55.96	99.74
flor de mayo	salino	10 mM	0.0	15.03	47.49	37.41	99.94
flor de mayo	salino	90 mM	0.0	9.56	32.76	57.65	99.96

La titulación de las muestras de raíz para la cuantificación de los grupos funcionales de la epidermis nos proporciona una información muy relevante que nos permite explicar los resultados obtenidos. Para la variedad Bayo, los datos muestran un

cambio importante en lo que podría ser la activación, desactivación y/o desnaturalización de proteínas o péptidos de membrana, esto debido a que es una variedad sensible a la salinidad. En el caso de la variedad Flor de mayo, los datos están mostrando lo que seguramente corresponde a la activación de canales dependientes de voltaje, los cuales participan en la resistencia a salinidad.

Lo que podemos observar de manera general para la variedad Flor de mayo es que, en los casos de aumento de salinidad, ya sea crónica y/o aguda, se presenta un aumento de los grupos fenólicos. Se ha determinado que el OG tiene una alta afinidad por los grupos hidroxilo, con los cuales forma anclajes muy estables (Hu *et al.*, 2014). Los grupos hidroxilo están presentes en los grupos fenólicos, los cuales, debido al pH de trabajo de esta investigación, no tendrían actividad química al encontrarse protonados; sin embargo, debe considerarse que el pKa de un grupo funcional depende también de la vecindad de otros grupos, así como de la accesibilidad que esos mismos grupos permitan. Además, debe considerarse la posible presencia de grupos OH en la pared celular que, por las técnicas empleadas en esta investigación, no fuera posible determinar. Por último, se sabe que los enlaces formados entre el OG son capaces de degradar los péptidos de la membrana, lo cual ocasiona la pérdida de la integridad de esta y, por tanto, la pérdida de sus funciones, derivando finalmente en la inhibición del desarrollo (Golkaram & Van Duin, 2015; Siddiqui *et al.*, 2015 Orth *et al.*, 2016).

## **6.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

### **6.4.1 MICROGRAFÍAS SEM**

En la Figura 19 se presenta una imagen del tratamiento control de radícula de la variedad Bayo. En ella se observa el aspecto de la epidermis en condiciones normales. En estas condiciones, no se observa ningún cuerpo extraño en la epidermis.

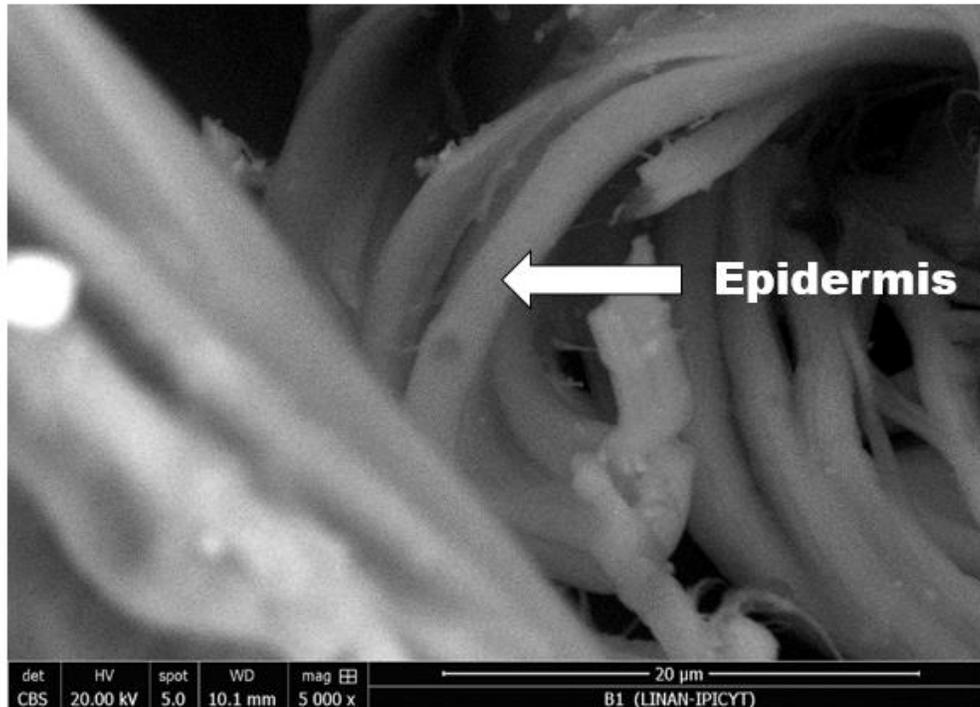


Figura 19. Micrografía de muestra control de raíz de la variedad Bayo (5000x).

En la Figura 20 se presenta una micrografía de muestra de radícula de la variedad Bayo en tratamiento de 1500 ppm de OG. Se observa la epidermis recubierta por una capa de OG que se adhiere a la pared celular y se acumula entre paredes celulares marcando contraste entre células. La explicación de la adhesividad del OG sobre la epidermis depende de varios factores. Entre los ya mencionados, se encuentran los enlaces entre el OG y los grupos OH presentes en la composición de la raíz; además, también se presentan atracciones electrostáticas entre las láminas de OG y la superficie de la epidermis, esto genera enlaces  $\pi$ - $\pi$ , los cuales mantiene las láminas de OG sobre la epidermis, alterando su función y permeabilidad. Es posible apreciar que las láminas de OG que recubren la epidermis de la raíz; al tratarse de un tratamiento de OG sin salinidad, no están floculadas, y por lo tanto, en su forma extendida (con su tamaño promedio de 632 nm), recubre completamente la epidermis de la raíz (Golkaram & Van Duin, 2015; Siddiqui *et al.*, 2015).

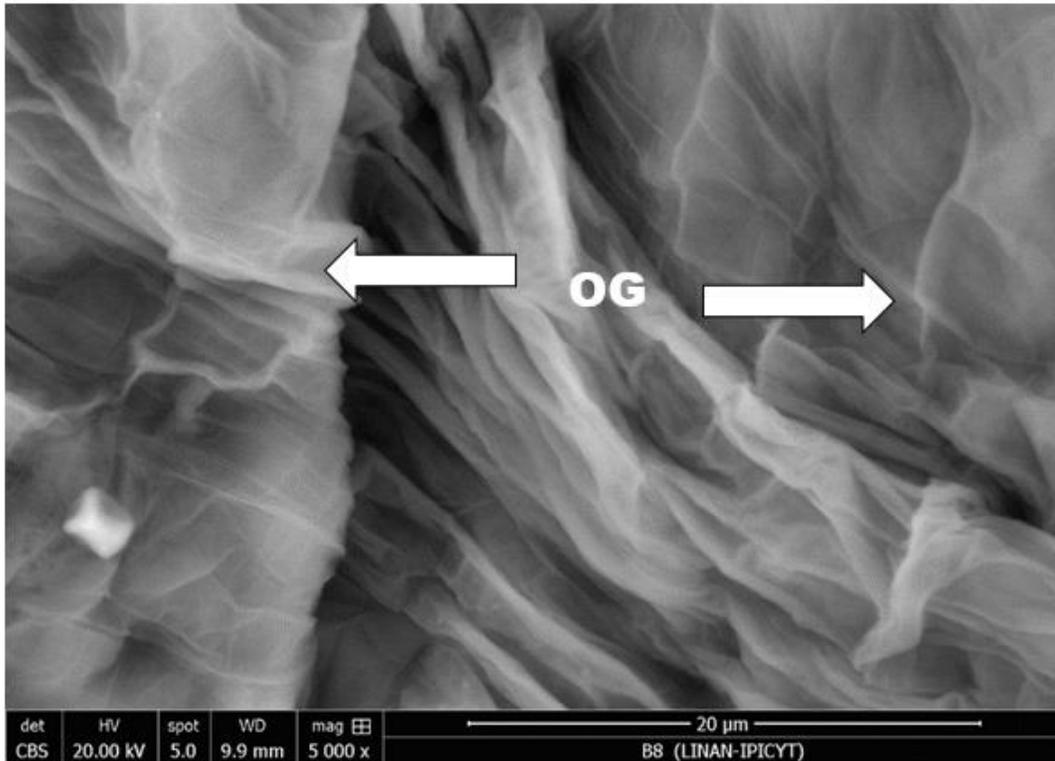


Figura 20. Micrografía de muestra de raíz de la variedad Bayo en el tratamiento de 1500 ppm OG (5000x).

En la Figura 21 se presenta una imagen de raíz en el tratamiento combinado de 90 mM de NaCl y 1500 ppm de OG. En ella se observan las láminas de OG sobre la epidermis de la raíz, pero no completamente adheridas, lo cual puede explicarse por el hecho de que en este tratamiento las láminas de OG están floculadas, y es posible que se pierda la capacidad de formar los enlaces con los grupos OH de la epidermis. Sin embargo, se mantiene la capacidad de realizar los enlaces  $\pi$ - $\pi$ , mediante los cuales se genera la adhesión entre el OG y la epidermis de la raíz.

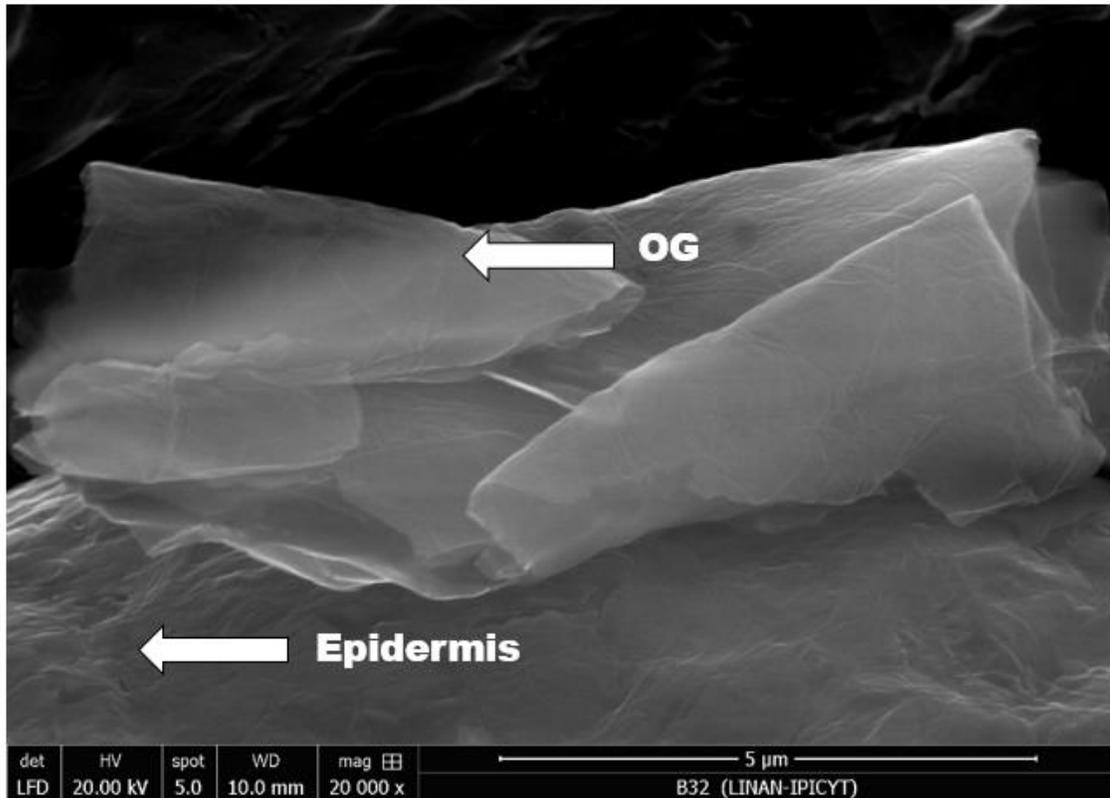
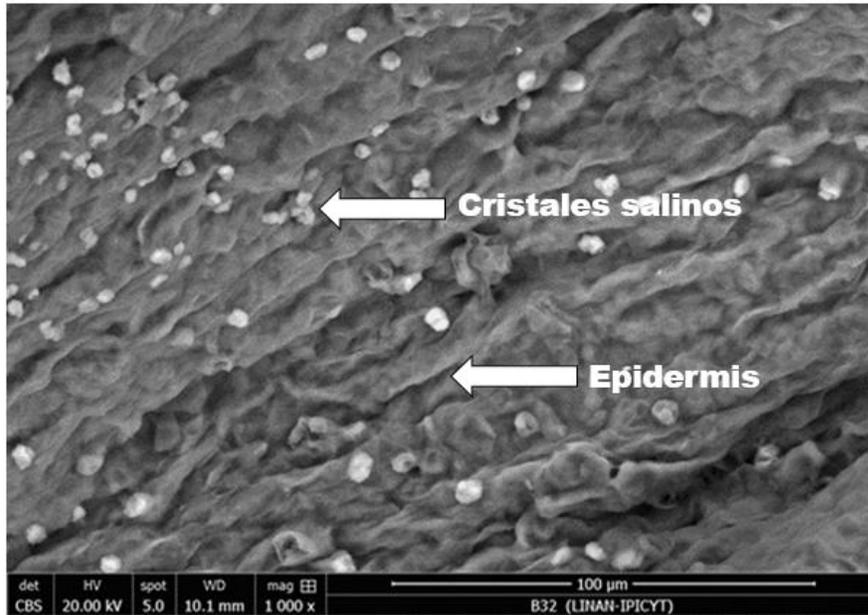


Figura 21. Micrografía de muestra de raíz de la variedad Bayo en el tratamiento de 90 mM NaCl y 1500 ppm OG (20000x).

#### 6.4.2 Análisis EDS

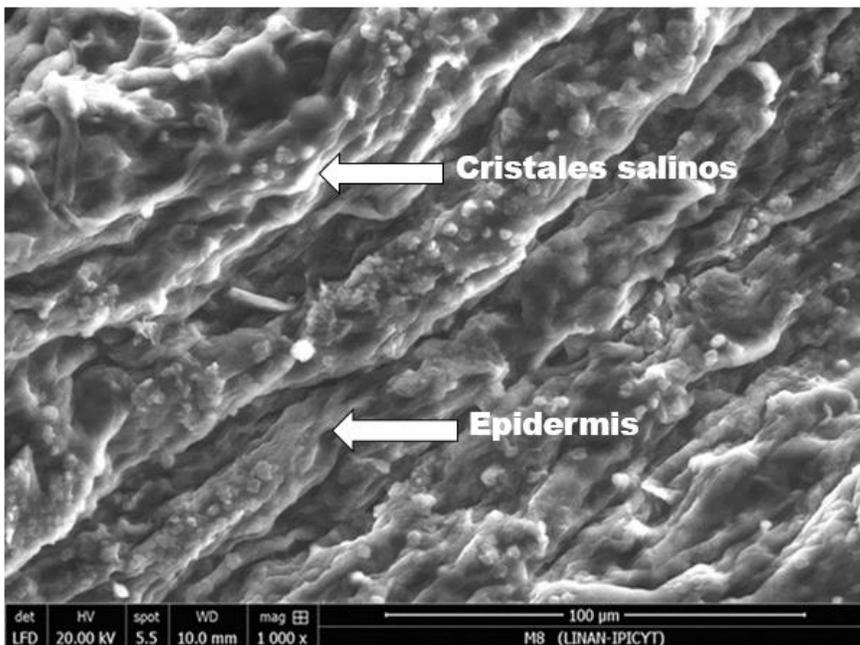
En la Figura 22 se presenta la imagen de la epidermis de raíz de la variedad Bayo, cultivada en el tratamiento de 90 mM de NaCl y 1500 ppm de OG. Se observan cristales salinos, los cuales presentan contenido de Na, K, Ca y Cl. Estos resultados nos indican que la salida de  $K^+$  de la raíz, así como la liberación de  $Ca^{2+}$  de la membrana celular, son provocadas por el estrés salino. La comprobación de la presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular es sumamente importante, ya que para OG, se ha descrito que los cationes divalentes forman complejos muy estables con las láminas de OG, lo que disminuye de manera muy importante su estabilidad en agua (Chowdhury *et al.*, 2015). Aunado a este complejo, la materia orgánica también puede formar a su vez un complejo con el grupo OG- $Ca^{2+}$ , lo cual provoca que el OG se desestabilice aún más, causando finalmente la floculación de las NP de OG.



Elemento	Porcentaje
C	40.84
O	42.18
Na	3.38
K	1.31
Ca	9.09
Cl	1.04

Figura 22. Micrografía y análisis EDS de raíz de la variedad Bayo en el tratamiento de 90 mM de NaCl y 1500 ppm OG (1000x).

En la Figura 23 se observa la epidermis de raíz de la variedad Flor de mayo. Al igual que el ejemplo anterior, se pueden apreciar los cristales salinos precipitados sobre la superficie, los cuales contienen Na, K, Ca y Cl. En este caso, estos resultados también estarían soportando la hipótesis de que el estrés abiótico provoca la liberación de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ .



Elemento	Porcentaje
C	16.77
O	38.22
Na	4.37
K	0.75
Ca	17.13
Cl	1.15

Figura 23. Micrografía y análisis EDS de raíz de la variedad Flor de mayo en el tratamiento de 90 mM de NaCl y 1500 ppm OG (1000x).

Los análisis EDS también proporcionaron valiosa información sobre los iones que se encuentran en el espacio extracelular, pues corroboran la presencia de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ ; el primero nos permite explicar la disminución del desarrollo de las plántulas y el segundo nos permite entender como las láminas de OG adoptan forma de flóculos, lo que reduce su tamaño y facilita su ingreso al espacio intercelular por la vía del apoplasto, y al espacio intercelular, muy probablemente mediante canales iónicos no específicos (Ulate Montero, 2013).

## 6.5 ESTRUCTURA ANATÓMICA DEL ÁPICE DE LA RAÍZ

En la Figura 24 se puede observar la sección transversal de la radícula de la variedad Bayo en el tratamiento control. Es posible apreciar una capa de células de la epidermis con una forma regular, así como el córtex, endodermis y cilindro vascular.

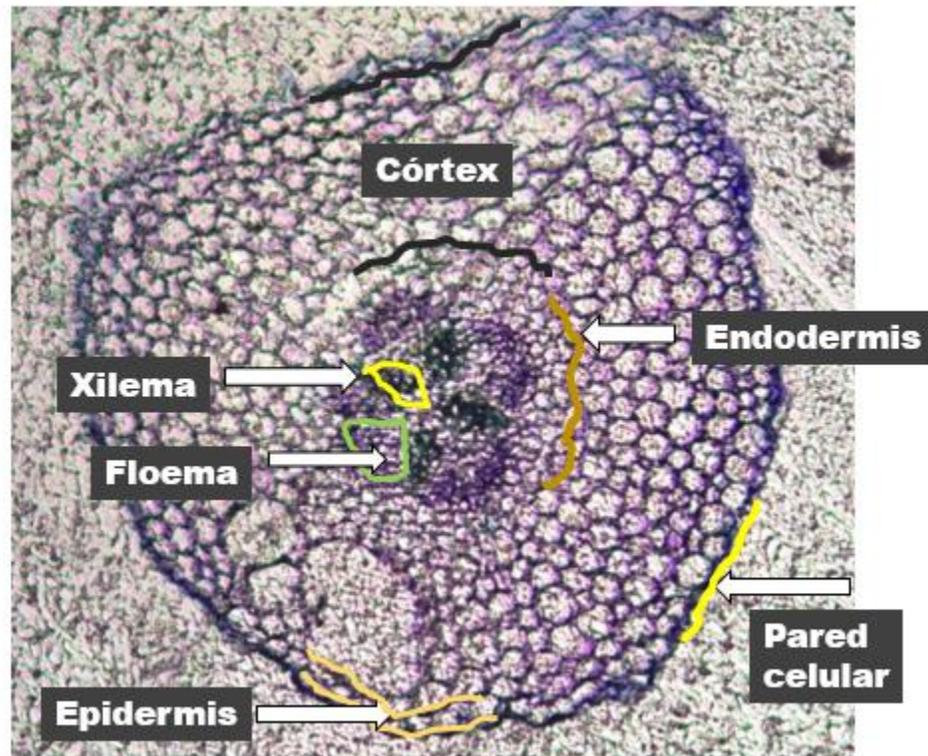


Figura 24. Sección transversal de radícula, tratamiento control de la variedad Bayo. 20x

En la Figura 25 se presenta la sección transversal de la radícula del tratamiento control de la variedad Bayo. Se puede observar la forma regular y turgente de las células de la epidermis, así como la refringencia normal de las paredes celulares en la epidermis y en el córtex. Debido a su grosor natural, las paredes celulares son capaces de desviar la luz que incide sobre ellas. La importancia de esto radica en poder comparar el control y las muestras con OG, ya como se explicará más adelante, el OG en las paredes celulares les confiere un color y consistencia diferente a éstas.

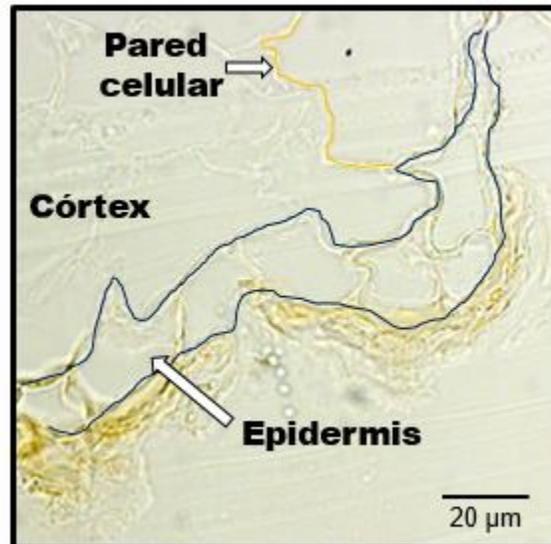


Figura 25. Corte anatómico de radícula de la variedad Bayo, muestra control, 100x en microscopio de campo claro.

En la Figura 26 se puede observar la sección transversal de la radícula de la variedad Bayo correspondiente al tratamiento 1500 ppm de OG. Se pueden apreciar las partículas de OG adheridas sobre la pared de las células de la epidermis (color marrón oscuro), así como partículas de óxido de grafeno que se acumula en los espacios intercelulares de la epidermis, absorbidas vía apoplasto. Como ya se explicó anteriormente, el OG queda adherido a la epidermis mediante enlaces  $\pi$ - $\pi$  entre las láminas de OG y la epidermis, así como los enlaces entre los grupos OH y el OG; esto aplicaría para las láminas más grandes. En el caso del OG que entra vía apoplasto, debe tratarse de las láminas de menor tamaño, que son capaces de transportarse por esta vía, la cual transporta agua y nutrientes de manera inespecífica. En la Figura 26 también es posible observar el OG adherido de manera continua sobre la epidermis, lo cual se corrobora con las micrografías descritas anteriormente.

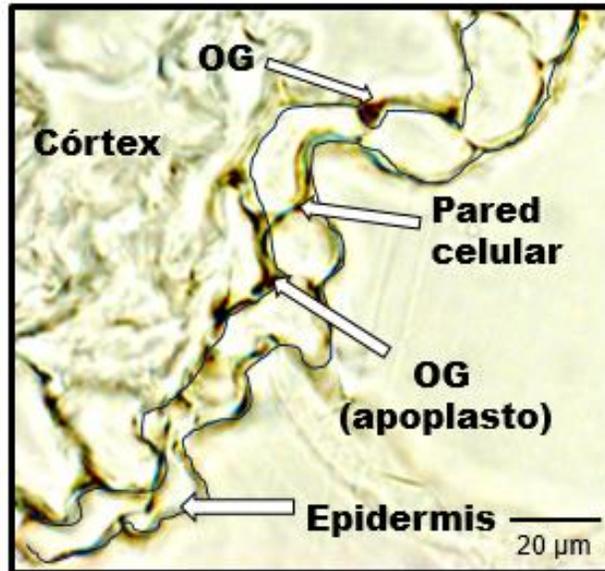


Figura 26. Sección transversal de radícula de la variedad Bayo, tratamiento 1500 ppm OG, microscopio de campo claro, 100x.

En la Figura 27, se presenta un diagrama de las vías apoplasto y simplasto en la raíz. Mediante la vía apoplasto, es posible que ingresen partículas de OG de 200 nm o menos, mientras que por la vía simplasto, podrían ingresar a la epidermis partículas de OG de 15 nm o menos (Maurer-Jones *et al.*, 2013). Es importante considerar que las láminas de OG son flexibles, de tal manera que sus dimensiones se podrían acoplar a las dimensiones de las vías apoplasto y simplasto.



Figura 27. Diagrama de las vías apoplasto y simplasto en raíz (Jos *et al.*, 2009).

En la Figura 28 se observa la sección transversal de la radícula de la variedad Bayo, correspondiente a los tratamientos de 90 mM de NaCl y 1500 ppm de OG. Se aprecian las partículas de OG adheridas sobre la pared de las células de la epidermis, así como también OG entre los espacios intercelulares (apoplasto) y en el citoplasma (simplasto). Las imágenes muestran que la difusión de las partículas de OG, tanto por la vía del apoplasto como la de canales iónicos, está en función de la concentración. Se puede apreciar que, a diferencia del tratamiento que no incluye salinidad, el OG se adhirió a la epidermis irregularmente, en las cuales se aprecia el OG adherido sobre la epidermis, pero en algunas partes de la pared se concentra más, mostrando un color más oscuro.

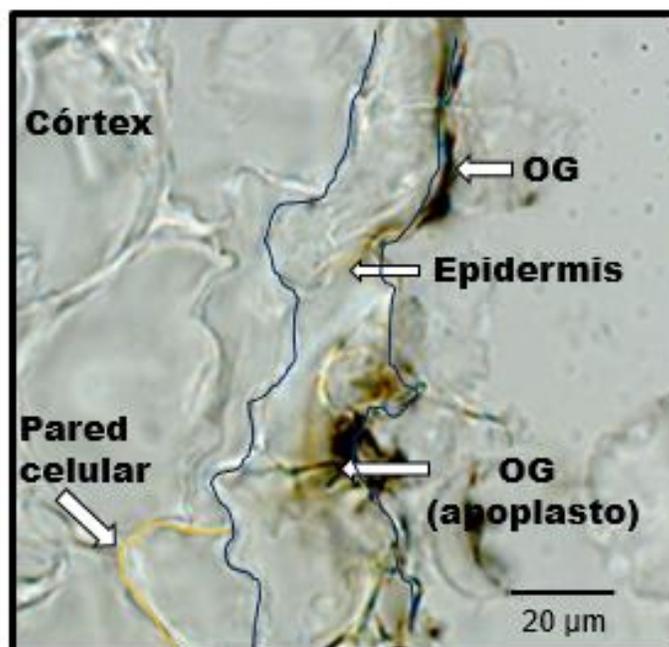


Figura 28. Sección transversal de radícula de la variedad Bayo, en el tratamiento de 90mM NaCl y 1500 ppm OG, microscopia de campo claro, 100x.

Con las imágenes obtenidas, es posible observar las partículas de OG en las paredes celulares y el interior del citosol de las células de epidermis. También, se observó que la cantidad de OG que ingresa al citosol es dependiente de la concentración de OG empleado en el tratamiento.

Según Ulate Montero (2013) y Chowdhury *et al.* (2015), pueden ser al menos dos mecanismos por los que probablemente las láminas de OG ingresan a la célula. Primeramente, por la vía del apoplasto, el cual es un espacio intercelular de cuya amplitud oscila entre 100 y 200 nm, a través del cual fluye el agua por difusión pasiva hacia el interior del córtex y, al ingresar las moléculas de agua, llevan consigo los solutos disueltos (Noguchi *et al.*, 2014). En dichas imágenes es posible observar las partículas de OG que han migrado a través de este espacio. El OG se observó en forma de gránulos, los cuales pudieron haberse generado al interactuar el OG con

el  $\text{Ca}^{2+}$  desprendido de la membrana celular; ya en forma de flóculos, el OG interacciona con la epidermis mediante enlaces  $\pi$ - $\pi$ , quedando retenido sobre esta. En segundo lugar, los gránulos de OG que se observan en el citosol pueden estar ingresando a través de las acuaporinas no selectivas (que permiten el ingreso al citoplasma de partículas de 20 a 30 nm), las cuales transportan, por ejemplo, azúcares disueltos, glicerol o urea, entre otras. Estas acuaporinas permiten el paso de moléculas a base de carbono; siendo que el OG es también un material carbonoso, pueden estar utilizando este tipo de conductos para ingresar al citoplasma. Se observa que, en este caso, la difusión también depende de la concentración, ya que se ha descrito que la simple interacción de NMC con la membrana celular no es suficiente para que puedan ingresar a la célula.

En la Figura 29 se observa una sección transversal de radícula de la variedad Flor de mayo, correspondiente al tratamiento control. Se pueden apreciar las paredes celulares con su refringencia normal, así como la morfología característica de las células de la epidermis. Las paredes celulares se observan más transparentes comparadas con la variedad Bayo, indicando con esto un menor grosor.

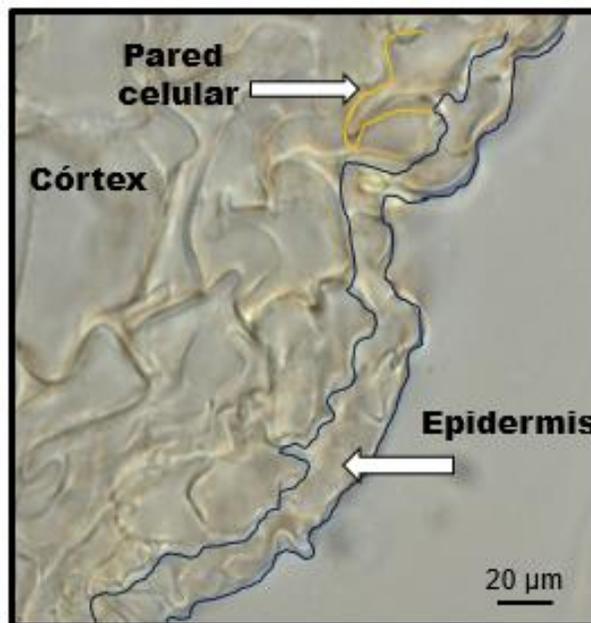


Figura 29. Sección transversal de radícula de la variedad Flor de mayo, tratamiento control, microscopio de campo claro, 100x.

En la Figura 30 se observa una sección transversal de radícula de la variedad Flor de mayo, correspondiente al tratamiento de 1500 ppm de OG. Se aprecian las partículas de OG adheridas sobre la pared celular de la epidermis, estas acumulaciones presentan un color marrón oscuro, También partículas de OG acumulado entre las paredes celulares (apoplasto), así como partículas de óxido de grafeno concentradas en las vacuolas (contenido color oscuro) y en el citoplasma.

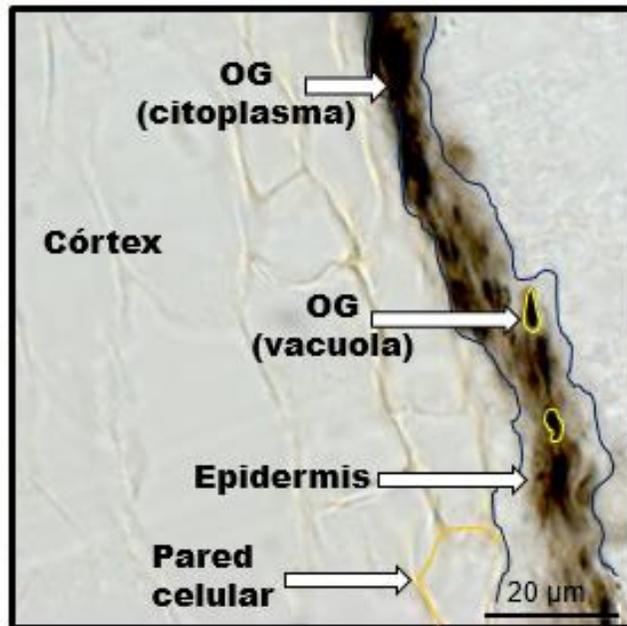


Figura 30. Sección transversal de radícula de la variedad Flor de mayo en el tratamiento de 1500 ppm OG, microscopía de campo claro, 100x.

En la Figura 31 se muestra una sección transversal de la radícula de la variedad Flor de mayo correspondiente al tratamiento 60 mM de NaCl y 1500 ppm de OG. Se pueden apreciar las células de la epidermis con las paredes celulares contraídas, debido a la deshidratación ocasionada por la elevada concentración de NaCl.

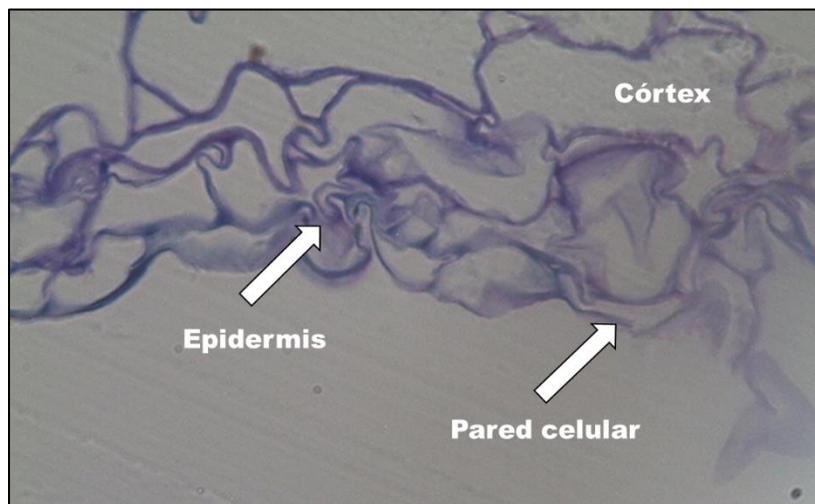


Figura 31. Sección transversal de radícula de la variedad Flor de mayo en el tratamiento 60 mM NaCl y 1500 ppm OG, 100x.

En la Figura 32 se observa la sección transversal de la radícula de la variedad Flor de mayo, correspondiente al tratamiento 90 mM de NaCl y 1500 ppm de OG. Se aprecian las partículas de OG adheridas sobre la pared de las células de la epidermis en forma irregular con una apariencia de grumos en donde se concentra más. Así como también OG en los espacios intercelulares (apoplasto), en las vacuolas y el citoplasma.

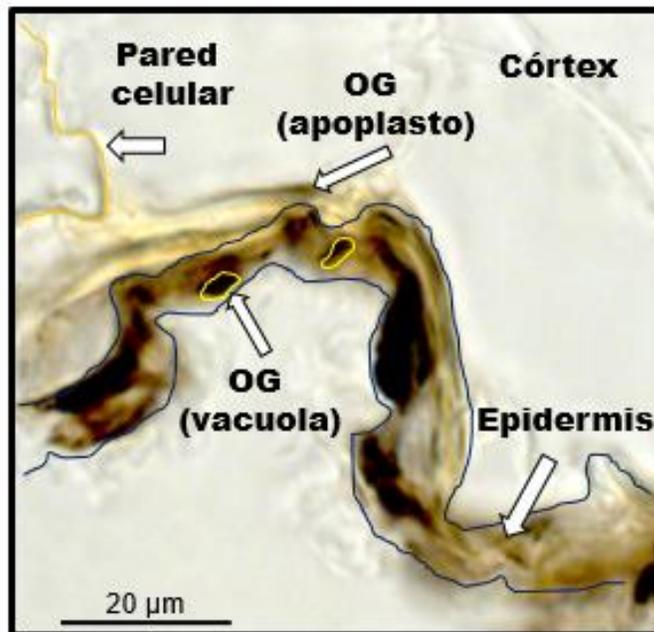


Figura 32. Sección transversal de radícula de la variedad Flor de mayo, tratamiento de 90 mM NaCl y 1500 ppm OG, microscopía de campo claro, 100x.

En este caso, debido a la presencia de alta concentración salina, las láminas de OG forman flóculos incluso antes de estar en contacto con la plántula y, al igual que para la variedad Bayo, los gránulos de OG entrarían al tejido también por vía apoplástica y por la vía de canales iónicos o transportadores, posiblemente acuaporinas.

## **7. CONCLUSIONES**

El porcentaje de germinación solo se ve afectado en los casos de mayor estrés abiótico.

El estrés abiótico ocasiona un aumento del tiempo medio de germinación en variedades sensibles, lo cual significa que germinan más lento; mientras que en variedades tolerantes el tiempo medio puede incluso disminuir. La tasa media de germinación se afecta de manera inversamente proporcional.

En variedades sensibles el índice de sincronización puede no verse modificado, mientras que en variedades resistentes puede aumentar.

El grado de afectación del desarrollo está determinado de manera mayoritaria por la variedad y la concentración en la que esté presente el estrés abiótico.

El estrés abiótico modifica la arquitectura de la raíz de manera proporcional a la concentración en la que dicho estrés se encuentre.

La absorción de los gránulos de OG por la raíz es principalmente por vía apoplástica. Por vía canales no específicos ingresa al citoplasma, acumulándose en la vacuola con mayor concentración; este efecto es dependiente de la concentración.

## 8. PERSPECTIVAS

En futuros estudios complementarios a este, podrían incluirse análisis referentes a la medición de enzimas de estrés y/o especies reactivas de oxígeno. Se sabe que los nanotubos de carbono (NTC) tienen efectos fitotóxicos en las células vegetales debido a la agregación, lo que conlleva a la acumulación de ROS que a su vez es dependiente de la dosis de NM, lo que finalmente causa la muerte celular. El G y el OG pueden tener la capacidad de generar la producción de ROS, en base a las similitudes de algunas de las propiedades de las láminas de grafeno con los NTC (Begum *et al.*, 2011). Se ha reportado que esto se debe a la acumulación de OG, junto con lesiones de daño necrótico y fuga de electrolitos, lo que en conjunto indica un mecanismo de estrés de oxidativo (Al-Ghamdi *et al.*, 2014; Begum *et al.*, 2011; Mogharabi, Abdollahi, & Faramarzi, 2014).

## ANEXO I

### 6.2.2 Tiempo medio de germinación

Los resultados del ANOVA indicaron que, para la respuesta de tiempo medio de germinación, la única variable explicativa que no es significativa es el OG. Todas las demás influyen en la respuesta (Tabla 8).

Tabla 8. Tabla de ANOVA con los resultados del tiempo medio de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad en dos variedades de frijol.

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F	Pr > F
Modelo	63	149.706	2.376	24.005	< 0.0001
Error	192	19.006	0.099		
Total Corregido	255	168.712			
Variedad	1	115.505	115.505	1166,817	< 0.0001
NaCl	4	2.540	0.635	6.414	< 0.0001
OG	7	0.711	0.102	1.026	0.414
Variedad*NaCl	4	9.826	2.457	24.816	< 0.0001
Variedad*OG	7	2.229	0.318	3.217	0.003
NaCl*OG	20	13.178	0.659	6.656	< 0.0001
Variedad*NaCl*OG	20	5.717	0.286	2.888	< 0.0001

En la observación de los resultados para cada variedad de manera independiente, se puede ver que en la variedad Bayo hubo diferencias significativas con respecto del control en los tratamientos 60 y 90 mM de NaCl, 30 mM de NaCl con 50 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 25 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 1000 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 25 ppm de OG y 90 mM de NaCl con 50 ppm de OG. En todos los casos, estas diferencias representaron un aumento del tiempo medio de germinación, lo cual significa que germinaron más lento (Figura 33).

Para la variedad Flor de mayo, se presentaron diferencias respecto del control en los tratamientos 90 mM de NaCl, 25 ppm de OG, 100 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 50 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 200 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 500 ppm de OG y 90 mM de NaCl con 1000 ppm de OG. En todos los casos, estas diferencias representan una disminución en el tiempo medio de germinación, o sea que germinaron más rápido (Figura 34).

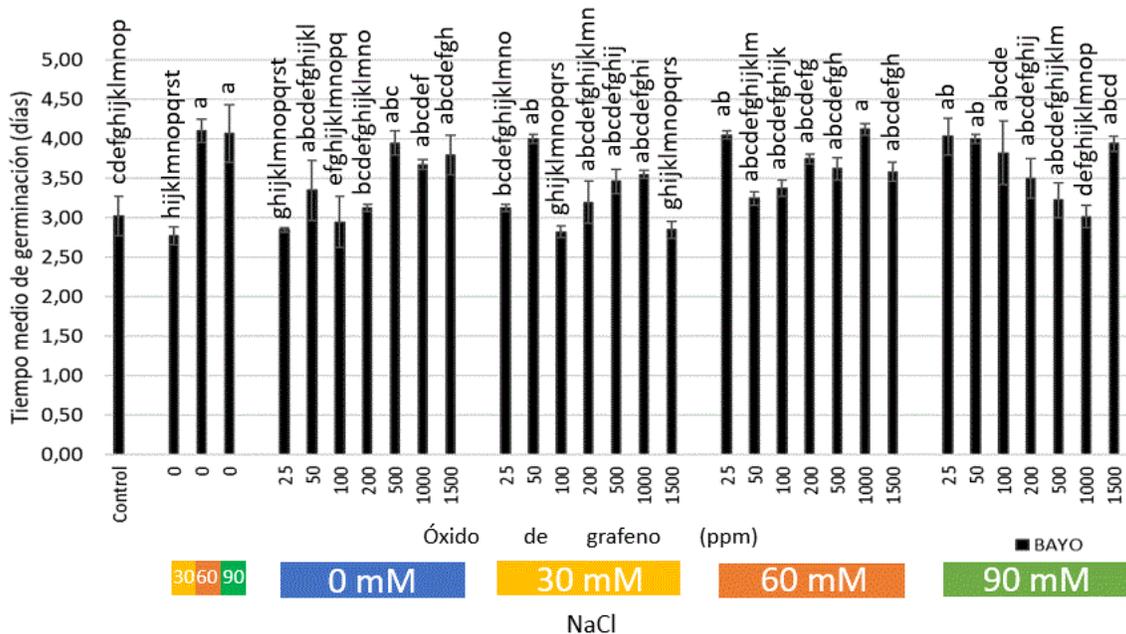


Figura 33. Tiempo medio de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Bayo.

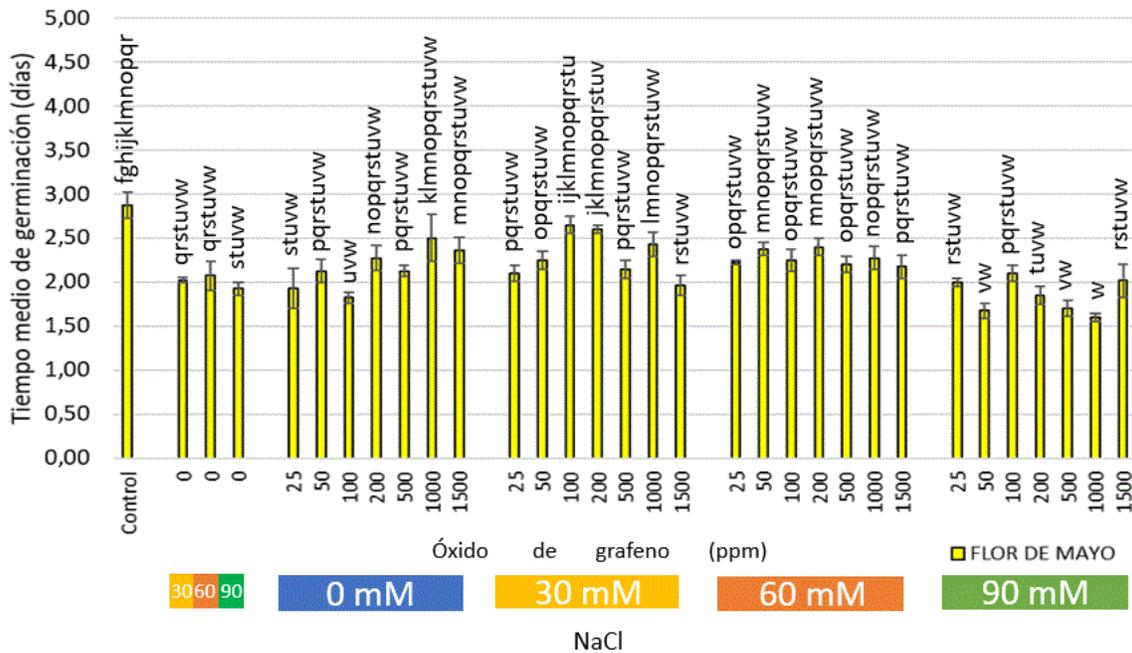


Figura 34. Tiempo medio de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Flor de mayo.

De manera específica, en los tratamientos de salinidad, se encontraron diferencias significativas a 60 mM y 90 mM con respecto al control para la variedad Bayo (representando esta diferencia un aumento del tiempo medio de germinación), y a

90 mM para la variedad Flor de mayo (en este caso, la diferencia significativa corresponde una disminución de este parámetro). Cuando se compararon estas diferencias entre variedades, se observó que la respuesta prácticamente se duplica, lo que indica que, en estos tratamientos, la variedad Bayo emplea dos veces más tiempo para germinar con respecto de la variedad Flor de mayo.

Esto nos corrobora que la variedad si influye en la respuesta, ya que los resultados para ambas variedades son muy diferentes. Esto se explica porque la variedad Flor de mayo, al presentar tolerancia a la salinidad, es capaz de realizar de manera más efectiva los ajustes osmóticos necesarios para poder obtener el agua de imbibición y poder germinar. Por el contrario, la variedad Bayo, al ser una variedad sensible a este factor de estrés abiótico, no es capaz de realizar estos ajustes de manera tan eficiente y, por lo tanto, disminuye para esta el porcentaje de germinación a altas concentraciones de NaCl. También, para la variedad Bayo, se cumple la hipótesis de que en altas concentraciones del factor de estrés el efecto es negativo.

En el caso de los tratamientos de OG, se observó que, para la variedad Bayo, no se presentaron diferencias significativas en los tratamientos. En el caso de la variedad Flor de mayo, se presentaron diferencias significativas en los tratamientos de 25 y 100 ppm de OG, representando estas diferencias una disminución en el tiempo medio de germinación.

En el caso de las combinaciones de NaCl y OG se encontró que, para la variedad Bayo, aunque se presentaron diferencias significativas en algunos tratamientos, la tendencia general es que no hubo un cambio en el tiempo medio de germinación y, en los casos que presentaron diferencias significativas, estas corresponden a un aumento en este parámetro. Por otra parte, para la variedad Flor de mayo, se observó que, en los tratamientos de OG con 90 mM de NaCl si se presentaron varias diferencias significativas y, para esta variedad, las diferencias correspondieron a una disminución del tiempo medio de germinación. Con estos resultados, se comprobó que la variedad influye en la respuesta.

En la comparación de resultados de ambas variedades respecto de un mismo tratamiento, no se presentaron diferencias en los tratamientos control, 30 mM de NaCl, 25 ppm de OG, 200 ppm de OG, 30 mM de NaCl con 100 ppm de OG, 30 mM de NaCl con 200 ppm de OG, 30 mM de NaCl con 1500 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 50 ppm de OG; en todos los demás tratamientos se observaron diferencias y estas representaron un aumento del tiempo medio de germinación para la variedad Bayo y con una disminución de este parámetro para la variedad Flor de mayo.

Los resultados de tiempo medio de germinación nos muestran que la variedad Flor de mayo se ajusta mejor cuando se presenta un bajo potencial hídrico, y de hecho este fenómeno puede favorecerle en esta respuesta, ya que disminuye el tiempo medio de germinación. Por otra parte, para la variedad Bayo, vemos que la disminución del potencial hídrico le perjudica en la mayoría de los casos, ya que el tiempo medio de germinación puede aumentar considerablemente.

Los resultados mostraron que, en términos generales, al aumentar el estrés, mayor diferencia existe entre variedades; en la variedad Bayo aumenta de manera significativa el tiempo medio de germinación (germinan más lento), mientras que para la variedad Flor de mayo este parámetro disminuye (germinan más rápido).

En cuanto a las diferencias entre variedades, una variedad sensible como la variedad Bayo es afectada de manera negativa por el estrés, y aumenta su tiempo medio de germinación, es decir, debido al estrés se requiere más tiempo para que germinen la semillas, mientras que por otro lado, la variedad Flor de mayo presenta tolerancia al estrés abiótico, e incluso esto impacta de manera positiva el tiempo medio de germinación, ya que germinan más rápido.

### 6.2.3 Tasa media de germinación

Los resultados del ANOVA mostraron que, a excepción del OG, todas las variables explicativas que influyen en esta respuesta (Tabla 9).

Tabla 9. Tabla de ANOVA con los resultados de la tasa media de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad en dos variedades de frijol.

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F	Pr > F
Modelo	63	2.846	0.045	21.941	< 0.0001
Error	192	0.395	0.002		
Total Corregido	255	3.241			
Variedad	1	2.154	2.154	1046,353	< 0.0001
NaCl	4	0.102	0.026	12.422	< 0.0001
OG	7	0.012	0.002	0.832	0.562
Variedad*NaCl	4	0.225	0.056	27.296	< 0.0001
Variedad*OG	7	0.040	0.006	2.757	0.009
NaCl*OG	20	0.245	0.012	5.951	< 0.0001
Variedad*NaCl*OG	20	0.068	0.003	1.645	0.046

En los resultados para cada variedad de forma independiente, se observó que para la variedad Bayo no hubo diferencias entre los tratamientos (Figura 35), mientras que para la variedad Flor de mayo, se presentaron diferencias en los tratamientos 30, 60 y 90 mM de NaCl con 25 ppm de OG; 30 mM de NaCl con 1500 ppm de OG; 90 mM de NaCl con 25 ppm de OG; 90 mM de NaCl con 50 ppm de OG; 90 mM de NaCl con 200 ppm de OG; 90 mM de NaCl con 500 ppm de OG; 90 mM de NaCl con 1000 ppm de OG y 90 mM de NaCl con 1500 ppm de OG, estas diferencias representan un aumento en la tasa media de germinación, lo cual quiere decir que, para la variedad Flor de mayo, al aumentar el estrés abiótico, aumenta también la cantidad de semillas que germinan por día (Figura 36).

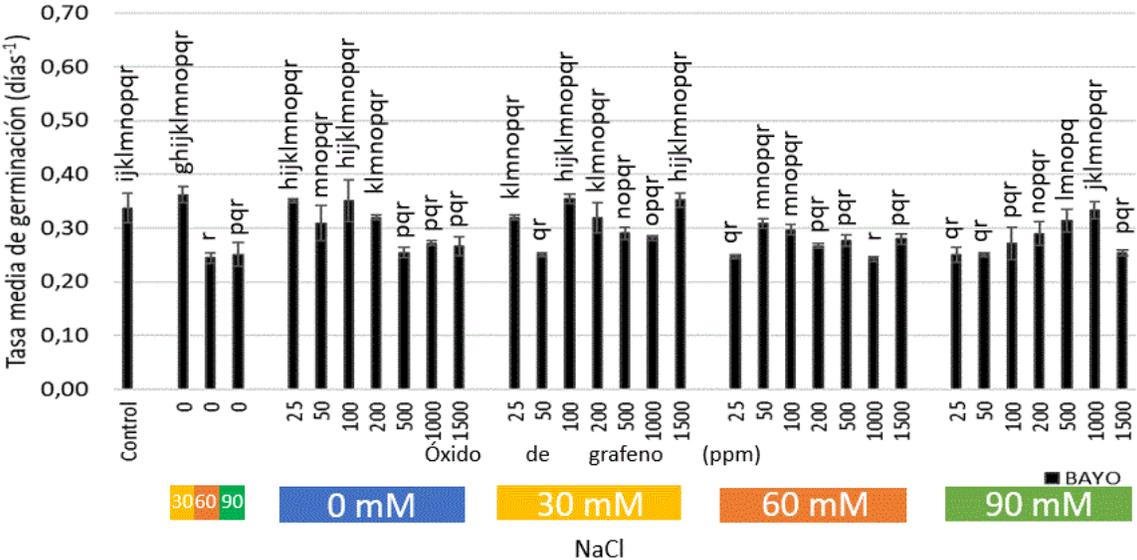


Figura 35. Tasa media de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Bayo.

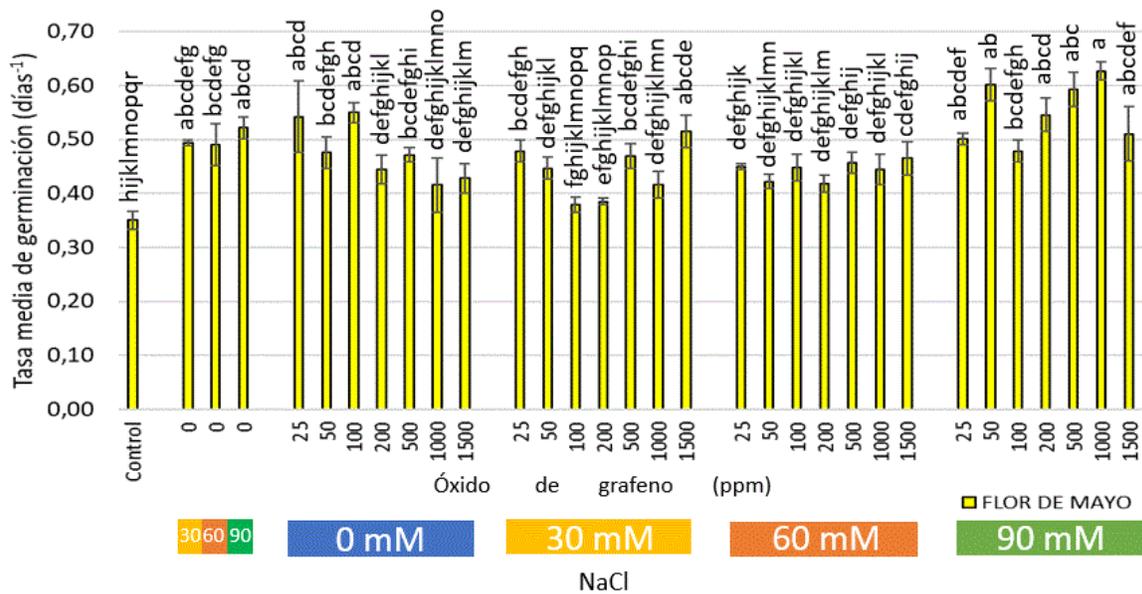


Figura 36. Tasa media de germinación para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Flor de mayo.

En lo referente a los tratamientos de estrés salino, los resultados del análisis estadístico muestran una evidente diferencia en la respuesta entre variedades. El estrés salino en la variedad Bayo, provoca que el valor de la tasa media de germinación disminuya, lo que se traduce en una disminución en el número de semillas que germinan por día, como ya se ha mencionado, esta variedad es sensible a la salinidad. Por otra parte, en la variedad Flor de mayo, el estrés salino provocó un aumento en el valor de la tasa media de germinación, es decir, germinan más semillas por día. De la misma manera, como ya se mencionó, esta variedad es tolerante a la salinidad, por lo que es capaz de realizar ajustes osmóticos eficientes que incluso mejoran la tasa media de germinación respecto del control-

En los tratamientos correspondientes a OG como único factor de estrés abiótico, al analizar cada variedad por separado, se observó que la variedad Bayo no presentó diferencias entre tratamientos, mientras que la variedad Flor de mayo presentó un aumento de la tasa media de germinación en los tratamientos 25 y 100 ppm, con una tendencia semejante en el resto de los tratamientos. En el caso de esta variedad, el estrés generado por el OG afectó positivamente el valor de la tasa media de germinación, lo cual también comprueba la hipótesis de que un bajo estrés puede mejorar la respuesta.

En los resultados para los tratamientos de combinación de NaCl y OG, se observaron comportamientos similares a los ya descritos. En el caso de la variedad Bayo, no hay diferencias entre el control y los tratamientos. Por otra parte, en la

variedad Flor de mayo, existen diferencias en los tratamientos, lo que se observó sobre todo en la combinación de OG con 90 mM de NaCl representando esta variación un aumento en la tasa media de germinación. Nuevamente, esta variedad presenta tolerancia al estrés, lo que le permite incluso aumentar la cantidad de semillas que germinan por día en presencia de estrés.

Finalmente, al comparar las dos variedades en un mismo tratamiento, no se presentaron diferencias en los tratamientos control, 30 mM de NaCl, 200 ppm de OG, 30 mM de NaCl con 100 ppm de OG, 30 mM de NaCl con 200 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 50 ppm de OG; en todos los demás tratamientos si hay diferencias significativas y representan una menor tasa media de germinación de la variedad Bayo con respecto a la variedad Flor de mayo (Tabla 13, anexo I).

En síntesis, debido al estrés abiótico la tasa media de germinación para la variedad Bayo presentó tendencia a disminuir, lo que significa que germinan menos semillas por día; mientras que la para la variedad Flor de mayo, la tasa media aumenta y, por lo tanto, germinan más semillas por día.

#### 6.2.4 Índice de sincronización

Los resultados muestran que todas las variables explicativas influyen en esta respuesta (Tabla 10).

Tabla 10. Tabla de ANOVA con los resultados del índice de sincronización para los diferentes tratamientos de salinidad en dos variedades de frijol.

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F	Pr > F
Modelo	63	2.330	0.037	6.977	< 0.0001
Error	192	1.018	0.005		
Total Corregido	255	3.348			
Variedad	1	1.305	1.305	246.200	< 0.0001
NaCl	4	0.211	0.053	9.952	< 0.0001
OG	7	0.119	0.017	3.194	0.003
Variedad*NaCl	4	0.188	0.047	8.874	< 0.0001
Variedad*OG	7	0.078	0.011	2.096	0.046
NaCl*OG	20	0.204	0.010	1.921	0.013
Variedad*NaCl*OG	20	0.226	0.011	2.132	0.005

Cuando se analizaron los resultados para las variedades de forma independiente, se obtuvo que, para la variedad Bayo, no hay cambio en el índice de sincronización (Figura 37); mientras que para la variedad Flor de mayo, en los tratamientos de 90

mM de NaCl, 500 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 500 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 25 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 50 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 1000 ppm de OG se presentaron diferencias significativas respecto del control (Figura 38), correspondiendo éstas a aumentos de la respuesta, lo cual indica que esta variedad germinó de manera más homogénea en presencia de estrés abiótico.

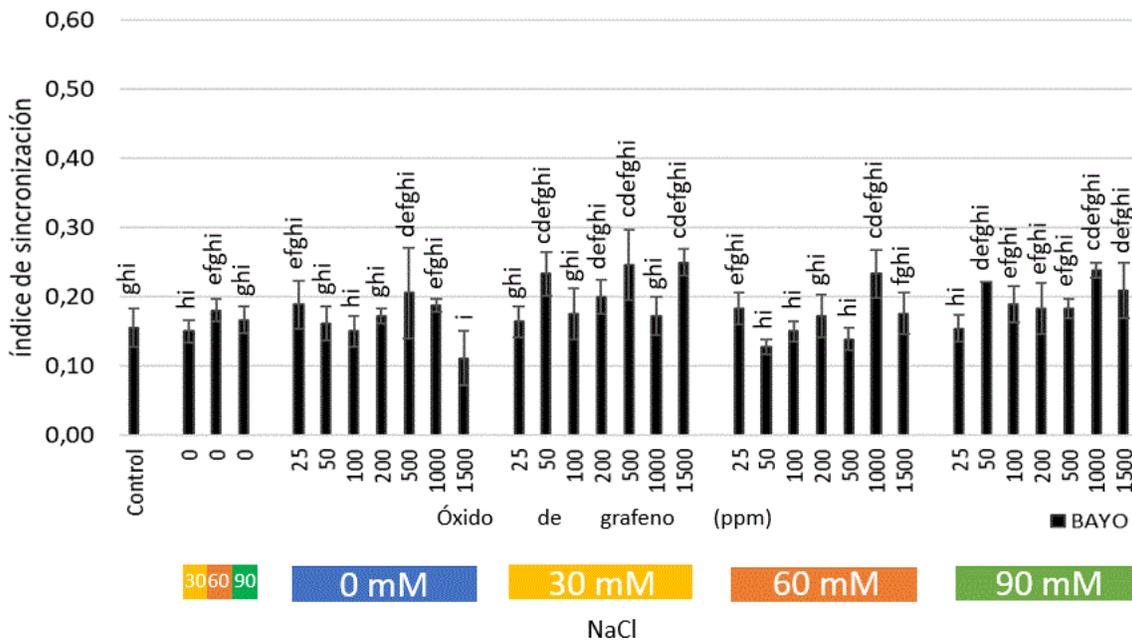


Figura 37. Índice de sincronización para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Bayo.

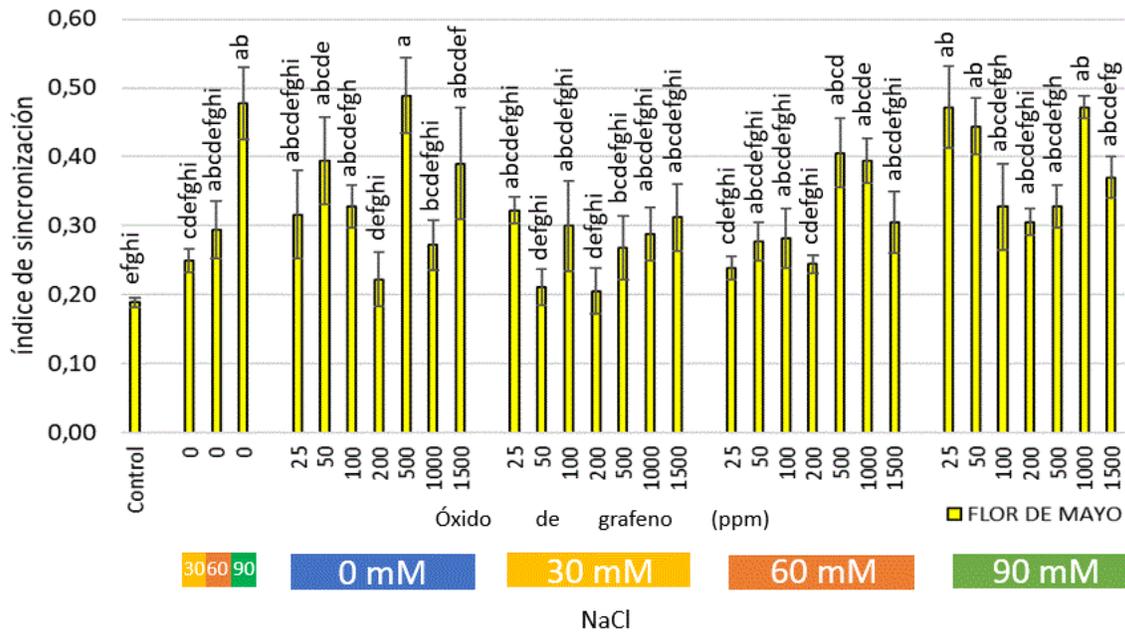


Figura 38. Índice de sincronización para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno para la variedad Flor de mayo.

En el caso de los tratamientos de estrés salino como único factor de estrés abiótico, para la variedad Bayo no se presentaron diferencias significativas; mientras que para la variedad Flor de mayo, se observó que solo en el tratamiento de 90 mM de NaCl se presentó diferencia significativa, representando ésta un incremento del índice de sincronización para la variedad Flor de mayo, lo cual indica que, en este caso, las semillas de esta variedad germinan de una manera más homogénea, es decir, cuando germinan las semillas, aumenta la probabilidad de que sea de manera simultánea. Aunque en los demás tratamientos no hubo diferencia significativa, si se observó una tendencia de aumento de la respuesta en la variedad Flor de mayo.

En el caso de los tratamientos en los que se empleó OG como único factor de estrés, se observó que, para la variedad Bayo, no existe modificación de este parámetro; mientras que para la variedad Flor de mayo, se observó que el índice de sincronización aumentó en algunos tratamientos, aunque solo en el tratamiento de 500 ppm la diferencia fue significativa. En términos generales, se mantiene la tendencia un mayor índice de sincronización para la variedad Flor de mayo.

En los tratamientos de combinación de NaCl y OG, en 30 mM no se obtuvieron diferencias, pero, conforme aumentó el estrés salino, se presentaron también algunas diferencias significativas. La variedad Flor de mayo incrementó su índice de sincronización, mientras que la variedad Bayo no tuvo variaciones.

Cuando se compararon los resultados de variedades entre mismos tratamientos, el índice de sincronización resultó mayor para Flor de mayo en los tratamientos de 90 mM de NaCl, 50, 500 y 1500 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 500 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 25 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 50 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 1000 ppm de OG. Esto indica que la variedad Flor de mayo germina de manera más homogénea en presencia de estrés abiótico (Figura 36).

De manera general, los resultados muestran que cuando las variables NaCl y OG actúan como factores de estrés abiótico de manera independiente, la respuesta de índice de sincronización es diferente entre variedades, pero cuando estos factores actúan en combinación se observa que solo en la combinación de mayor estrés (90 mM de NaCl y OG) se presentan diferencias significativas.

El índice de sincronización nos indica que, cuando su valor se aproxima a 1, significa que la germinación es homogénea, mientras que cuando su valor se aleja de 1, indica que la germinación no es homogénea. En base a esto, podemos ver que el estrés abiótico con los factores aplicados de manera independiente, mejoran la sincronización para la variedad Flor de mayo, mientras para la variedad Bayo el estrés abiótico no modifica la sincronización.

## ANEXO II

### 6.3.2 Biomasa de raíces

Los resultados del análisis estadístico mostraron que todos los tratamientos y sus combinaciones afectaron la respuesta de acumulación de biomasa subterránea o de raíz (Tabla 11).

Tabla 11. Tabla de ANOVA con los resultados de biomasa subterránea para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en dos variedades de frijol.

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F	Pr > F
Modelo	63	0.00640	0.000102	21.331	< 0.0001
Error	192	0.00091	0.000005		
Total Corregido	255	0.00731			
variedad	2	0.00058	0.000288	60.479	< 0.0001
NaCl	4	0.00278	0.000695	146.479	< 0.0001
OG	7	0.00072	0.000103	21.589	< 0.0001
variedad*NaCl	6	0.00103	0.000172	36.034	< 0.0001
variedad*OG	12	0.00046	0.000038	8.014	< 0.0001
NaCl*OG	20	0.00060	0.000030	6.255	< 0.0001
variedad*NaCl*OG	12	0.00024	0.000020	4.171	< 0.0001

El análisis de las variedades de manera independiente, mostró que, para la variedad Bayo, con excepción de los tratamientos 1000 ppm de OG, 30 mM de NaCl con 50 ppm de OG, 30 mM de NaCl con 500 ppm de OG y 30 mM de NaCl con 1000 ppm de OG, hay diferencias significativas en todos los demás tratamientos y éstas representan una disminución de la biomasa subterránea (Figura 39).

En el caso de la variedad Flor de mayo, hay diferencias significativas en los tratamientos 90 mM de NaCl, 50, 100 y 500 ppm de OG, en todos representan también una disminución de la biomasa de raíz (Figura 40).

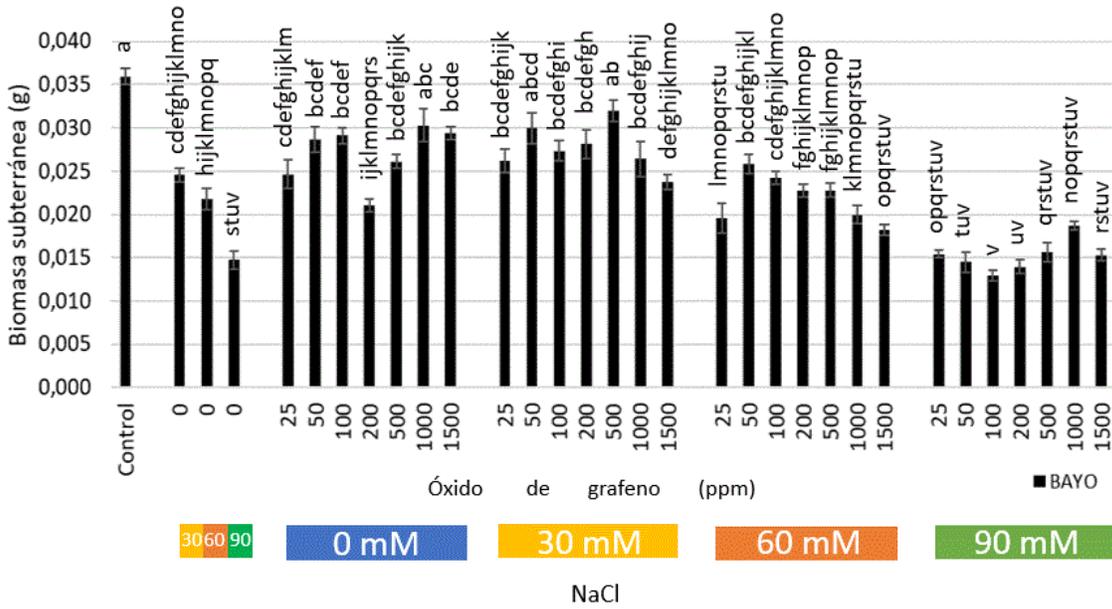


Figura 39. Biomasa subterránea para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Bayo.

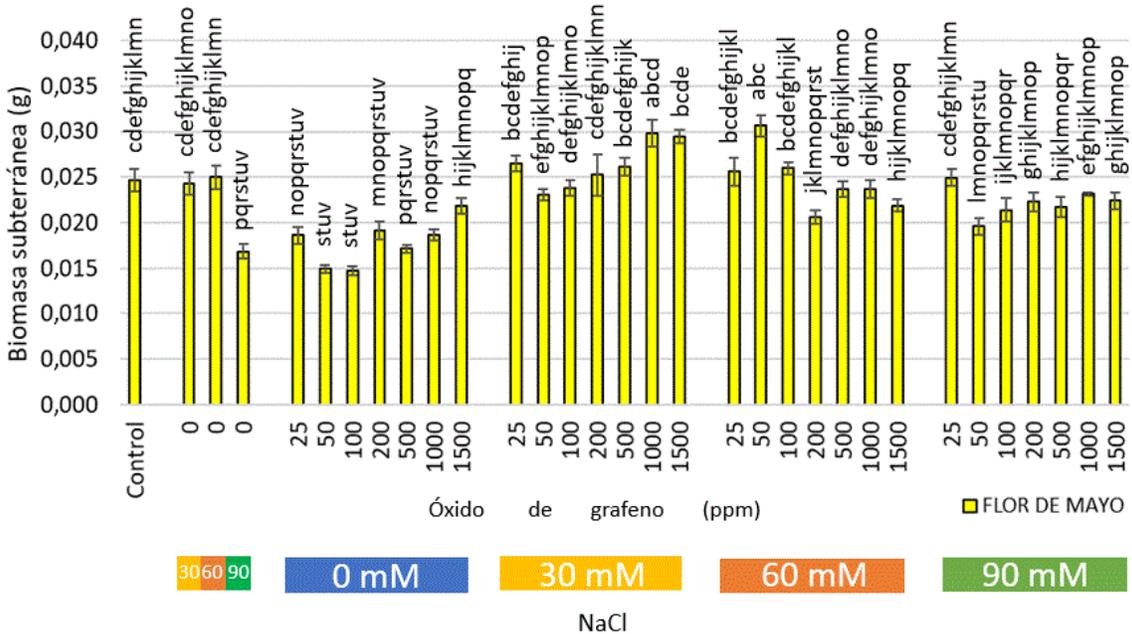


Figura 40. Biomasa subterránea para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Flor de mayo.

En el caso del NaCl como único factor de estrés, al comparar las variedades en mismos tratamientos, se observó que existen diferencias significativas respecto del

control, estas diferencias representan una disminución en la biomasa subterránea; sin embargo, para cada una de las tres diferentes concentraciones de NaCl en los tratamientos de estrés salino, no hubo diferencia entre variedades, es decir, en cada uno de los tratamientos, las dos variedades presentaron un decremento similar. Por otra parte, cuando se analizaron los resultados para las variedades de forma independiente, para la variedad Bayo se encontró un claro decremento en la biomasa subterránea, esta disminución fue progresiva al aumentar la concentración de NaCl. A 30 mM la reducción es de 30.55%, a 60 mM es de 38.8% y a 90 mM de 58.33%. En el caso de la variedad Flor de mayo, solo hubo diferencia en el tratamiento de 90 mM, con una reducción de 40%.

Estos resultados muestran que la variedad Bayo es más sensible a la salinidad, y este factor de estrés genera una reducción en la acumulación de biomasa en la raíz, mientras que la variedad Flor de mayo es más tolerante a la presencia de NaCl, y por lo tanto la acumulación de biomasa no es afectada de manera importante a concentraciones moderadas de salinidad. La reducción en la acumulación de biomasa está determinada por la resistencia al estrés salino que puede desarrollar cada variedad.

En el caso de los tratamientos de OG como único factor de estrés abiótico, y observando las variedades de manera independiente, para la variedad Bayo se encontraron diferencias en todos los tratamientos, la máxima reducción ocurrió a 200 ppm con una disminución aproximada de 41.66 % en la acumulación de biomasa de raíz. En el caso de la variedad Flor de mayo, se encontraron diferencias en todos los tratamientos, excepto a 1500 ppm; la mayor reducción ocurrió a 50 y 100 ppm, con una reducción aproximada del 24%.

Los resultados anteriores corroboran que la respuesta está influenciada por la variedad. Aunque ambas variedades son afectadas debido a que el OG forma un recubrimiento sobre la epidermis de la raíz, la variedad Flor de mayo es más tolerante a este estrés abiótico en comparación con la variedad Bayo.

En el caso de los tratamientos de combinación de 30 mM NaCl y OG, la variedad Bayo presentó una disminución en la acumulación de la biomasa subterránea. Por otra parte, no hubo diferencias para la variedad Flor de mayo en este rango de concentraciones.

En la combinación de 60 mM de NaCl y OG, al analizar los resultados para las variedades de manera independiente, se encontró una notable disminución en la acumulación de biomasa en todos los tratamientos de estrés para la variedad Bayo, presentándose la mayor disminución a 1500 ppm, siendo esta reducción de 47.22%.

Para la variedad Flor de mayo, en el tratamiento de 200 ppm se presentó un aumento en la acumulación de biomasa de 29.16%.

En la combinación de 90 mM y OG, al analizar los resultados para las variedades de manera independiente, se encontró para la variedad Bayo una importante reducción en la acumulación de biomasa en todos los tratamientos; presentándose el mayor decremento a 100 ppm con un 68.88 %. En el caso de la variedad Flor de mayo, por el contrario, no hubo disminución significativa en la biomasa de raíz.

Los resultados muestran de manera general que esta combinación de estrés afecta en mayor medida a la variedad Bayo, mientras que la variedad Flor de mayo es más resistente a estos tratamientos.

Para los tratamientos que presentan la combinación de los dos factores de estrés abiótico, podemos ver como al aumentar la salinidad disminuye también la acumulación de biomasa de raíz. Esto está directamente relacionado con la disminución del desarrollo general de la plántula.

Como se muestra en la Figura 41, otro de los efectos provocados por el estrés salino es la modificación de la arquitectura radicular. El estrés salino provocó una disminución en la longitud de la raíz principal y promovió el desarrollo de raíces secundarias.

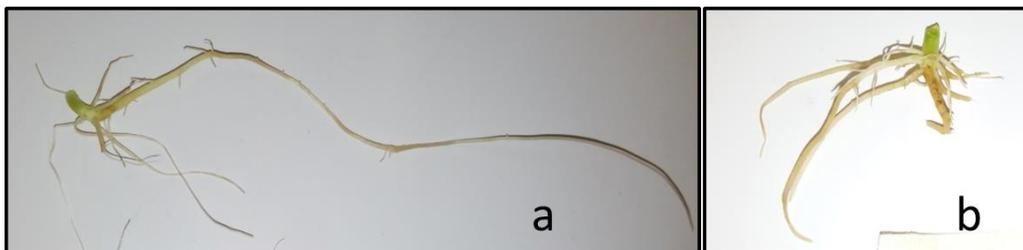


Figura 41. Comparación de la arquitectura radicular en variedad Bayo, a) control, b) 90 mM de NaCl.

Uno de los principales resultados fue la disminución en la biomasa de raíz al aumentar el estrés salino. Esto se debe a dos razones principales. En primer lugar, por el ajuste osmótico que la planta debe realizar para poder tolerar el estrés salino y poder disponer del agua que requiere para sobrevivir. La segunda es que, cuando el desarrollo ocurre en un medio salino (suelo o algún otro sustrato), donde se mantenga una humedad constante, las sales suelen permanecer en las capas más profundas y debido a ello las raíces disminuyen su longitud, activando a la vez un mecanismo que desarrolla las raíces adventicias, estos resultados ya has sido reportados para ésta y otras especies (Chulim *et al.*, 2014)

En los tratamientos con estrés salino, también se observó la modificación de la arquitectura radicular. Esta es una respuesta fisiológica mediante la cual la plántula busca localizar espacios en el suelo donde el estrés salino sea menor y con ello evadir este tipo de estrés. También se sabe que, en condiciones de estrés salino, la raíz asume la función de órgano de reserva, por lo que acumula biomasa para generar potenciales menores al medio salino en el cual se encuentra; esto a su vez inhibe su crecimiento (Pareek *et al.*, 2010; Begum *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2012; Seabra *et al.*, 2014).

### 6.3.4 Biomasa total

Los resultados muestran que todos los tratamientos y sus combinaciones afectaron la acumulación de biomasa total (Tabla 12).

Tabla 12. Tabla de ANOVA con los resultados de biomasa total para los diferentes tratamientos de salinidad en dos variedades de frijol.

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F	Pr > F
Model	63	0.062	0.000980	54.379	< 0.0001
Error	192	0.003	0.000018		
Corrected Total	255	0.065			
variedad	2	0.024	0.011961	663.742	< 0.0001
NaCl	4	0.024	0.006049	335.673	< 0.0001
OG	7	0.003	0.000388	21.548	< 0.0001
variedad*NaCl	6	0.003	0.000480	26.628	< 0.0001
variedad*OG	12	0.004	0.000360	19.970	< 0.0001
NaCl*OG	20	0.003	0.000156	8.667	< 0.0001
variedad*NaCl*OG	12	0.001	0.000048	2.686	0.002

El análisis de las variedades de forma independiente, mostró que, para la variedad Bayo, excepto en el tratamiento de 25 ppm de OG, se encontraron diferencias significativas en todos los tratamientos y éstas representan una disminución de la biomasa total respecto del control (Figura 42).

En el caso de la variedad Flor de mayo, hay diferencias significativas en los tratamientos: 60 y 90 mM de NaCl, 60 mM de NaCl con 200 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 1500 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 25 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 50 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 100 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 200 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 500 ppm de OG, 90 mM de NaCl con 1000 ppm de OG y 90 mM de NaCl con 1500 ppm de OG; y en todos representan también una disminución de la biomasa total (Figura 43).

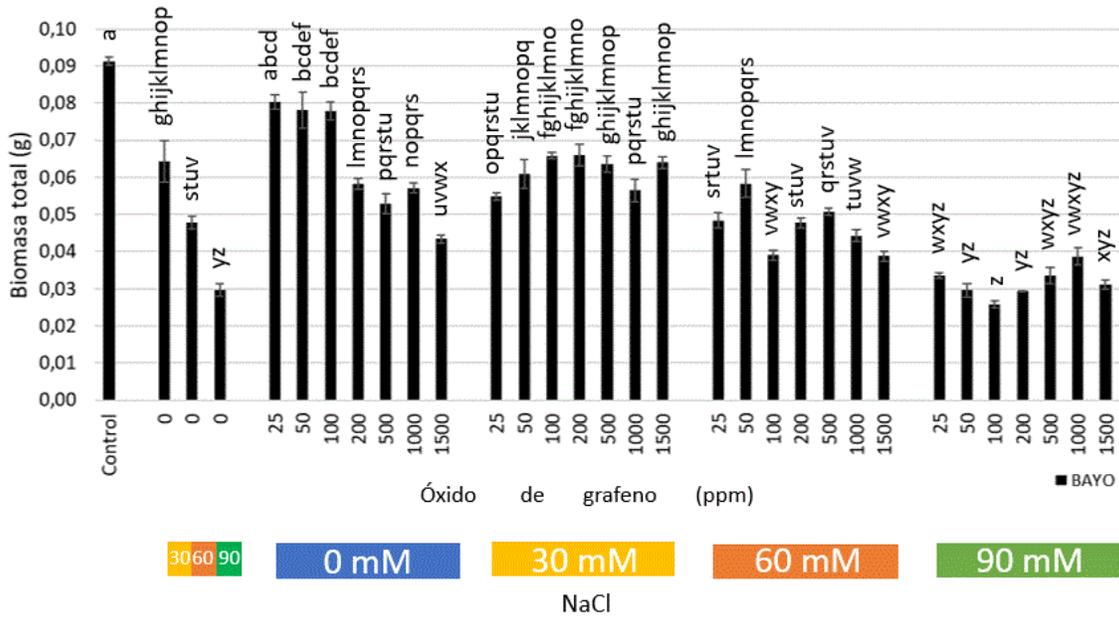


Figura 42. Biomasa total para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Bayo.

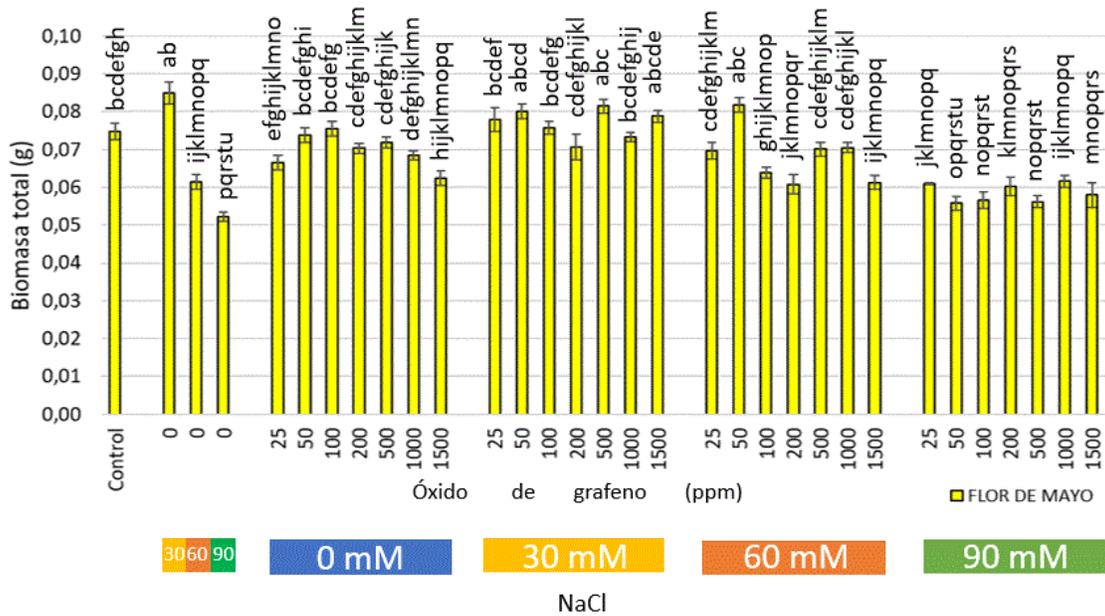


Figura 43. Biomasa total para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Flor de mayo.

En los tratamientos de salinidad como único factor de estrés, los resultados muestran, al compararse variedades en mismos tratamientos, que hay diferencias significativas de acumulación de biomasa total en todos los casos; en el control, 30,

60 y 90 mM y todas las diferencias representan una disminución en la biomasa total, con excepción de 30 mM para variedad Flor de mayo, en la cual se presenta un incremento en la acumulación de biomasa; en este caso, un ligero estrés por salinidad, favorece el desarrollo.

Cuando se compararon las variedades de manera independiente, se puede ver que, para la variedad Bayo, el estrés salino disminuyó la biomasa total en todos los casos, siendo la más severa a 90 mM, con una reducción de 66.67%. En el caso de la variedad Flor de mayo, en un estrés salino de 30 mM hubo un incremento de la biomasa total de 13.34%, mientras que para el resto de los tratamientos se encontró una disminución en la acumulación de biomasa; la mayor diferencia es a 90 mM con un 30.67%.

En los tratamientos con el OG como único factor de estrés, cuando vemos los resultados para las variedades de manera independiente, en el caso de la variedad Bayo se observa que, al incrementar el nivel de estrés, disminuye la acumulación de biomasa total, la mayor diferencia se presenta a 1500 ppm con una reducción de 55.55%. Para la variedad Flor de mayo, la única diferencia en reducción de biomasa se presenta a 1500 ppm, con un 16.44%. Estos resultados muestran que la variedad Bayo es más sensible al estrés y por ello disminuye su desarrollo, con lo cual disminuye también la acumulación de biomasa; en el caso de la variedad Flor de mayo, en términos generales no hay disminución en esta combinación de estrés.

En los tratamientos de combinación de 30 mM de NaCl y OG, se observa que en general la variedad Bayo acumula menor cantidad de biomasa total en comparación que la variedad Flor de mayo. Cuando observamos las variedades de forma independiente, vemos que, para la variedad Bayo, todos los tratamientos provocan una disminución en la biomasa total, presentándose la mayor reducción a 25 ppm con un 37.36%. Para la variedad Flor de mayo, es estrés abiótico generado en esta sección del desarrollo experimental, genera un ligero aumento de la biomasa total, aunque esta no es significativa en ninguno de los tratamientos. En conjunto, los resultados muestran que, para esta combinación de estrés abiótico, la variedad Flor de mayo presenta una mayor resistencia y, por lo tanto, acumula más biomasa total que la variedad Bayo.

En la combinación de 60 mM de NaCl y OG, cuando se comparan las variedades entre mismos tratamientos, se observa que hay diferencia en todos ellos, y también en todos los casos, existe mayor acumulación de biomasa total de la variedad Flor de mayo con respecto a la variedad Bayo. Con respecto a los resultados de las variedades de forma independiente, para la variedad Bayo se observa para todos los tratamientos un decremento en la biomasa total, siendo la mayor reducción en

los tratamientos de 100 y 1500 ppm, lo cual representa un 56.7%. Para la variedad Flor de mayo, el tratamiento 200 ppm presentan una disminución de biomasa total, con aproximadamente un 23% menos, el resto de los tratamientos no presenta diferencias. En esta combinación de estrés abiótico, se mantiene la tendencia de que la variedad Flor de mayo acumula más biomasa total que la variedad Bayo.

En la combinación de 90 mM de NaCl y OG, los resultados de comparación de variedades en mismos tratamientos, indican que existen diferencias en todos ellos, manteniéndose la tendencia de una mayor acumulación de biomasa total en la variedad Flor de mayo.

Cuando se compararon las dos variedades en un mismo tratamiento, se observó que no se presentaron diferencias en los tratamientos: 50, 100, 200 y 1000 ppm de OG, 30 mM de NaCl con 100 ppm de OG y 30 mM de NaCl con 200 ppm de OG; en todos los demás tratamientos si se presentaron diferencias significativas (Figura 35).

Para las variedades de manera independiente, para la variedad Bayo se observa que en todos los tratamientos existe una importante disminución en la acumulación de biomasa, si bien la reducción es bastante similar, la mayor diferencia a 100 ppm con una reducción de 74.75%. Para la variedad Flor de mayo se observa un comportamiento semejante, se presenta una disminución en todos los tratamientos respecto del control siendo esta disminución bastante similar en todos los casos, y la mayor reducción se presenta en el tratamiento de 100 ppm, con una disminución de 28.76%. Se mantiene el mismo patrón de mayor acumulación de biomasa por parte de la variedad Flor de mayo con respecto a la variedad Bayo.

Los resultados de esta investigación nos indican que, al aumentar la concentración de NaCl o de OG de manera independiente, existe un importante decremento en la acumulación de biomasa. En el caso de la salinidad, estos resultados son comparables con lo ya reportado (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2012; Cokkizgin, 2012; Chulim *et al.*, 2014). Por otra parte, los resultados de OG son similares a los reportados por Begum *et al.* (2011) quienes reportan que para la espinaca roja y la col, en altas concentraciones de G (1000 mg/L) disminuye la acumulación de biomasa total.

### **6.3.5 Relación Brote:Raíz**

Los resultados muestran que todas las variables explicativas influyen en la respuesta (Tabla 13).

Tabla 13. Tabla de ANOVA con los resultados de la relación brote:raíz para los diferentes tratamientos de salinidad en dos variedades de frijol.

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F	Pr > F
Modelo	63	138.969	2.206	35.570	< 0.0001
Error	192	11.907	0.062		
Total Corregido	255	150.876			
variedad	2	59.225	29.612	477.506	< 0.0001
NaCl	4	29.268	7.317	117.990	< 0.0001
OG	7	10.802	1.543	24.883	< 0.0001
variedad*NaCl	6	5.686	0.948	15.282	< 0.0001
variedad*OG	12	13.592	1.133	18.265	< 0.0001
NaCl*OG	20	17.865	0.893	14.404	< 0.0001
variedad*NaCl *OG	12	2.531	0.211	3.401	0.0001

El análisis de las variedades de forma independiente, mostraron que, para la variedad Bayo, hay diferencias significativas en los tratamientos: 30 mM de NaCl, 25, 500, 1000 y 1500 ppm de OG y 60 mM de NaCl con 100 ppm de OG; éstas diferencias representan una disminución en la relación brote:raíz, es decir, debido al estrés abiótico, esta variedad asigna una menor cantidad de recursos al desarrollo de la parte aérea (Figura 44).

En el caso de la variedad Flor de mayo, los tratamientos que presentan diferencias significativas son: 30 mM de NaCl, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm de OG y, en este caso, las diferencias representan un aumento en la relación brote:raíz; esto significa que esta variedad asigna, bajo este tipo de estrés abiótico, más recursos al desarrollo de la parte aérea que a la parte subterránea (Figura 45).

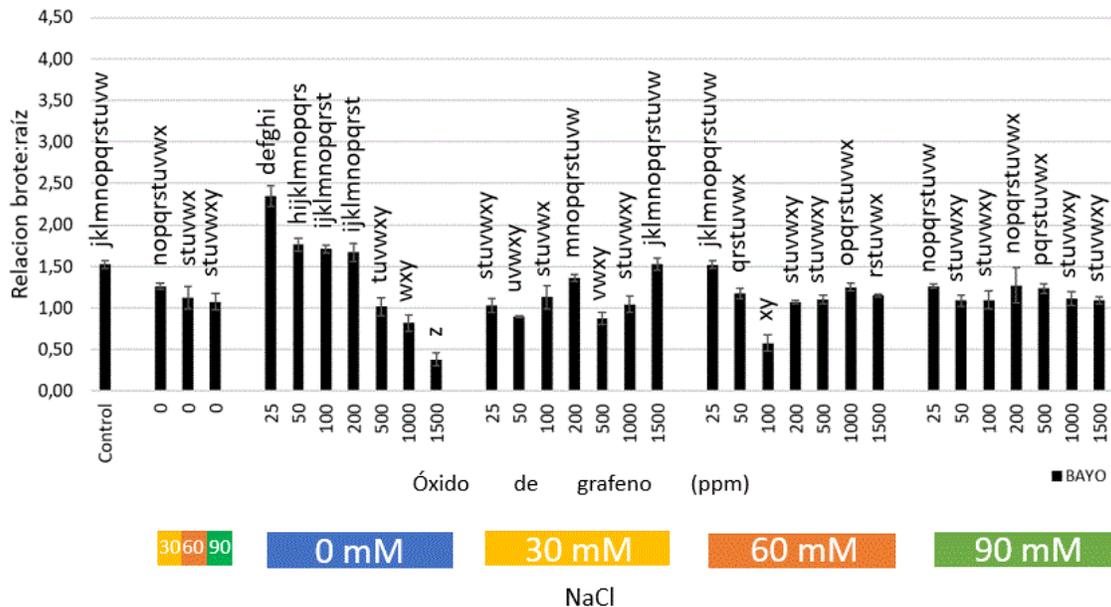


Figura 44. Relación brote:raíz para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Bayo.

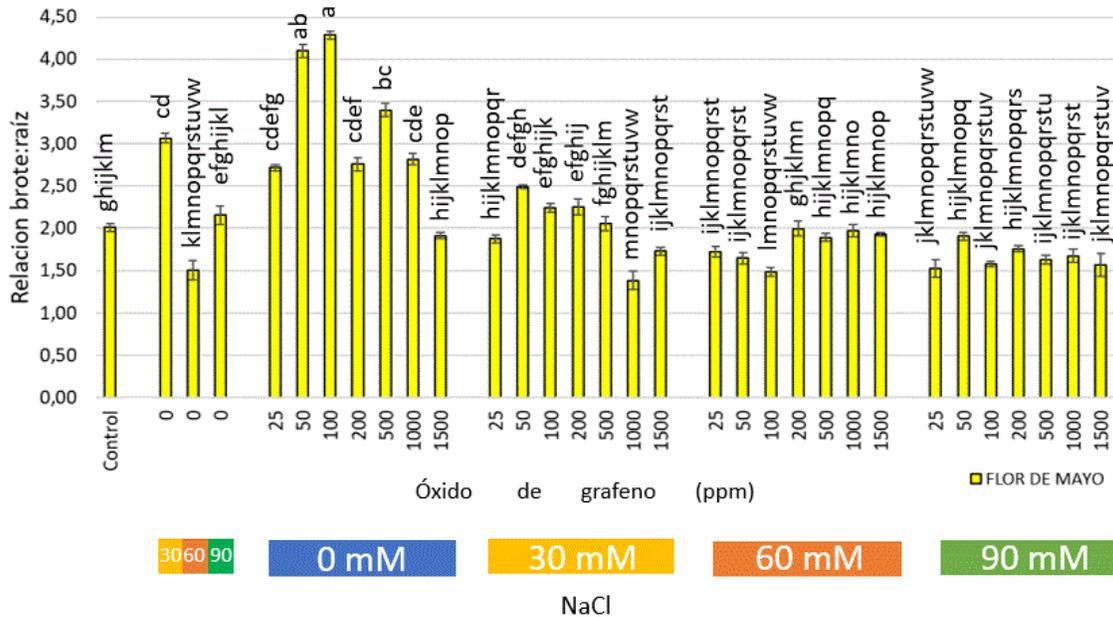


Figura 45. Relación brote:raíz para los diferentes tratamientos de salinidad y óxido de grafeno en la variedad Flor de mayo.

En el caso del estrés salino como único factor de estrés, al comparar las variedades en mismos tratamientos, en todos los tratamientos la proporción biomasa aérea/subterránea es mayor en la variedad Flor de mayo con respecto a la variedad Bayo, aunque las diferencias solo son significativas en los tratamientos 30 mM y 90 mM de NaCl. Los resultados para las variedades de manera independiente, nos muestran que, en el caso de la variedad Bayo, aunque existe una reducción en la proporción, en ningún caso es significativa. Por otra parte, para la variedad Flor de mayo, no se presentan diferencias significativas en la proporción biomasa aérea/biomasa subterránea.

Para el caso de los tratamientos de OG como único factor de estrés, en la figura 15 se puede observar que, al comparar las variedades en mismos tratamientos, existen diferencias en los tratamientos de 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm. La relación brote:raíz es mayor en todos los casos para la variedad Flor de mayo con respecto a la variedad Bayo. Para las variedades de forma individual, podemos ver que los resultados indican que el estrés generado por el OG en la variedad Bayo genera a 25 ppm un aumento en la relación brote:raíz, y posteriormente, al aumentar la concentración, esta proporción decrece progresivamente. En la variedad Flor de mayo, vemos que la proporción aumenta de manera importante en los tratamientos hasta 100 ppm, y posteriormente va decreciendo.

Para la combinación de NaCl y OG, aunque se observó una tendencia de una mayor relación brote:raíz para la variedad Flor de mayo con respecto de la variedad Bayo, solo se presentó diferencia significativa en el tratamiento 60 mM de NaCl con 100 ppm.

Cuando se compararon las dos variedades en un mismo tratamiento, se observó que se presentaron diferencias en los tratamientos: 30 y 90 mM de NaCl, 50, 100, 200, 500, 1000 y 1500 ppm de OG, 30 mM de NaCl con 25 ppm de OG, 30 mM de NaCl con 50 ppm de OG, 30 mM de NaCl con 100 ppm de OG, 30 mM de NaCl con 200 ppm de OG, 30 mM de NaCl con 500 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 100 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 200 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 500 ppm de OG, 60 mM de NaCl con 1500 ppm de OG y 90 mM de NaCl con 50 ppm de OG.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, F., & Rodrigues, D. F. (2013). Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community: a case study. *Journal of Hazardous Materials*, 256–257, 33–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.03.064>
- Akhavan, O., & Ghaderi, E. (2010). Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano*. <https://doi.org/10.1021/nn101390x>
- Al-Ghamdi, A. A., Gupta, R. K., Kahol, P. K., Wageh, S., Al-Turki, Y. A., El Shirbeeney, W., & Yakuphanoglu, F. (2014). Improved solar efficiency by introducing graphene oxide in purple cabbage dye sensitized TiO<sub>2</sub> based solar cell. *Solid State Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.ssc.2013.12.021>
- Al-Halafi, A. M. (2014). Nanocarriers of nanotechnology in retinal diseases. *Saudi Journal of Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1016/j.sjopt.2014.02.009>
- Andrade Espinosa, G., & Rangel Méndez, J. R. (2007). *Activación y Caracterización de Materiales Nanoestructurados (CNx y CST): Remoción de Cadmio*. IPICYT. Retrieved from <http://repositorio.ipicyt.edu.mx/bitstream/11627/66/1/AndradeEspinosaM.pdf>
- Ashwani Pareek, S.K. Sopory, Hans J. Bohnert, G. (2010). *Abiotic Stress Adaptation in Plants*. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3112-9>
- Aslani, F., Bagheri, S., Julkapli, N. M., Juraimi, A. S., Sadat, F., Hashemi, G., & Baghdadi, A. (2014). Effects of Engineered Nanomaterials on Plants Growth\_ An Overview, 2014.
- Aslani, F., Bagheri, S., Muhd Julkapli, N., Juraimi, A. S., Hashemi, F. S. G., & Baghdadi, A. (2014). Effects of engineered nanomaterials on plants growth: An overview. *Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/641759>
- Astruc, D. (2012). Electron-transfer processes in dendrimers and their implication in biology, catalysis, sensing and nanotechnology. *Nature Chemistry*. <https://doi.org/10.1038/nchem.1304>
- Ayers, R. S., Westcot, D. W., & FAO. (1985). *Water quality for agriculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2003). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGrawHill. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Baldwin, T., Caldwell, M. M., Heldmaier, G., Lange, O. L., Mooney, H. A., & Sommer, U. (2003). *Root Ecology*. Berlin Heidelberg: Ecological Studies 168, Springer.
- Bandyopadhyay, S., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2013). Advanced Analytical Techniques for the Measurement of Nanomaterials in

- Food and Agricultural Samples: A Review. *Environmental Engineering Science*. <https://doi.org/10.1089/ees.2012.0325>
- Baughman, R. H., Zakhidov, A. A., & de Heer, W. A. (2002). Carbon nanotubes--the route toward applications. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1060928>
- Bayuelo-Jimenez, J. S., Craig, R., & Lynch, J. P. (2002). Salinity tolerance of Phaseolus species during germination and early seedling growth. *Crop Science*, 42(5), 1584–1594.
- Bayuelo-Jiménez, J. S., Jasso-Plata, N., Ochoa, I., Ochoa, I., Bayuelo-Jiménez, J. S., ... Ochoa, I. (2012). Growth and Physiological Responses of Phaseolus Species to Salinity Stress. *International Journal of Agronomy*, 2012, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/527673>
- Begum, P., & Fugetsu, B. (2013). Induction of cell death by graphene in Arabidopsis thaliana (Columbia ecotype) T87 cell suspensions. *Journal of Hazardous Materials*, 260, 1032–41. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.063>
- Begum, P., Ikhtiari, R., & Fugetsu, B. (2011). Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce. *Carbon*, 49(12), 3907–3919. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.05.029>
- Bewley, J. D., & Bradford, K. J. (2013). *Seeds Physiology of Development, Germination and Dormancy* (3rd ed.). Springer.
- Bianco, A. (2013). Graphene: Safe or Toxic? The Two Faces of the Medal. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(19), 4986–4997. <https://doi.org/10.1002/anie.201209099>
- Bresinsky, A., Körner, C., Kadereit, J., Neuhaus, G., & Sonnewald, U. (2013). *Strasburger's Plant Sciences*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-15518-5>
- Campo Mexicano, S. (2005). Situación actual y perspectiva de Frijol en México. Retrieved from [http://www.campomexicano.gob.mx/portal\\_siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/Frijol00-05.pdf](http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/Frijol00-05.pdf)
- Chandna, R., Azooz, M. ., & Ahmad, P. (2013). *Recent Advances of Metabolomics to Reveal Plant Response During Salt Stress*. *Salt stress in plants*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6108-1>
- Chen, J., Li, H., Han, X., & Wei, X. (2015). Transmission and Accumulation of Nano-TiO<sub>2</sub> in a 2-Step Food Chain (Scenedesmus obliquus to Daphnia magna). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 95(2), 145–149. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1580-y>
- Chichiriccò, G., & Poma, A. (2015). Penetration and Toxicity of Nanomaterials in

- Higher Plants. *Nanomaterials*, 5(2), 851–873.  
<https://doi.org/10.3390/nano5020851>
- Chowdhury, I., Mansukhani, N. D., Guiney, L. M., Hersam, M. C., & Bouchard, D. (2015). Aggregation and Stability of Reduced Graphene Oxide: Complex Roles of Divalent Cations, pH, and Natural Organic Matter. *Environmental Science and Technology*, 49(18), 10886–10893.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01866>
- Chulim, Á. C., Guadalupe, L., Guerrero, R., Manuel, H., Escobar, O., & Crespo, E. C. (2014). Germinación y crecimiento de plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones de salinidad \* Germination and seedling growth of *Phaseolus vulgaris* L. in saline conditions Resumen Introducción, 5, 753–763.
- Cokkizgin, A. (2012). Salinity stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed germination. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1), 177–182. <https://doi.org/10.15835/nbha4017493>
- CONAGUA. (2007a). *PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES ATOTONILCO*. Mexico.
- CONAGUA. (2007b). *Programa de Sustentabilidad Hídrica de la Cuenca del Valle de México*. Mexico. Retrieved from  
<http://201.116.60.81/sustentabilidadhidricadelValledeMexico/Introduccion.aspx>
- CONAGUA. (2009). *Planta de tratamiento de aguas residuales Atotonilco. Coordinación de Proyectos del Valle de México. Subdirección General de Agua Potable, Drenaje y Saneamiento. Programa de Sustentabilidad Hídrica de la Cuenca del Valle de México PTAR Atotonilco*. MEXICO.
- Cornelissen, J. H. C., Lavorel, S., Garnier, E., Díaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D. E., ... Poorter, H. (2003). A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 51(4), 335–380. <https://doi.org/10.1071/BT02124>
- Delgado-Ramos, G. C. (2014). Nanotechnology in Mexico: Global trends and national implications for policy and regulatory issues. *Technology in Society*. <https://doi.org/10.1016/j.techsoc.2013.09.005>
- Deng, Y., White, J. C., & Xing, B. (2014). Interactions between engineered nanomaterials and agricultural crops: implications for food safety. *Journal of Zhejiang University SCIENCE A*, 15(8), 552–572.  
<https://doi.org/10.1631/jzus.A1400165>
- Diao, M., & Yao, M. (2009). Use of zero-valent iron nanoparticles in inactivating microbes. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.051>
- Dutschk, V., Karapantsios, T., Liggieri, L., McMillan, N., Miller, R., & Starov, V. M. (2014). Smart and green interfaces: From single bubbles/drops to industrial environmental and biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface*

Science. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.02.020>

- El-Temseh, Y. S., & Joner, E. J. (2012). Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. *Environmental Toxicology*. <https://doi.org/10.1002/tox.20610>
- Fadeel, B., Fadeel, B., Kagan, V., Kagan, V., Krug, H., Krug, H., ... Wiklund, L. (2007). There's plenty of room at the forum: Potential risks and safety assessment of engineered nanomaterials. *Nanotoxicology*, 1(2), 73–84. <https://doi.org/10.1080/17435390701565578>
- Furtado Macedo, A. (2012). *Abiotic Stress Responses in Plants. Abiotic Stress Response in Plants*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0634-1>
- Galloway, T. S. (2015). Micro- and Nano-plastics and Human Health. In *Marine Anthropogenic Litter* (pp. 343–366). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_13)
- Gama, P. B. S., Inanaga, S., Tanaka, K., & Nakazawa, R. (2007). Physiological response of common bean ( *Phaseolus vulgaris* L .) seedlings to salinity stress. *Journal of Biotechnology*, 6(January), 79–88.
- Gao, W. (2015). Synthesis, Structure, and Characterizations. In *Graphene Oxide* (pp. 1–28). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-15500-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-15500-5_1)
- Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Echlin, P., Joy, D. C., Romig, A. D., Lyman, C. E., ... Lifshin, E. (1992). Introduction. In *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis* (pp. 1–19). Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0491-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0491-3_1)
- Golkaram, M., & Van Duin, A. C. T. (2015). Revealing graphene oxide toxicity mechanisms: A reactive molecular dynamics study. *Materials Discovery*, 1, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.md.2015.10.001>
- Grieger, K. D., Hansen, S. F., & Baun, A. (2009). The known unknowns of nanomaterials: Describing and characterizing uncertainty within environmental, health and safety risks. *Nanotoxicology*, 3(3), 222–233. <https://doi.org/10.1080/17435390902944069>
- Guo, X., & Mei, N. (2014). Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials. *Journal of Food and Drug Analysis*. National Laboratories of Foods and Drugs.
- Gutierrez-Rodriguez, M., Escalante-Estrada, J. A., & Rodriguez-Gonzalez, M. T. (2005). Canopy Reflectance, Stomatal Conductance, and Yield of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus coccineus* L. Under Saline Field Conditions. *International Journal of Agriculture & Biology*, 7(2), 491–494. <https://doi.org/1560-8530/2005/07-3-491-494>

- Haghighi, M., & Teixeira da Silva, J. A. (2014). The effect of carbon nanotubes on the seed germination and seedling growth of four vegetable species. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 17(4), 201–208. <https://doi.org/10.1007/s12892-014-0057-6>
- Hamdy, A. (1992). Irrigation with treated municipal wastewater. *MEDIT 1/92*, Vol. 1(Medit, vol 3, n.1), 50–54.
- Hansen, S. F., Baun, A., Michelson, E. S., Kamper, A., Borling, P., & Stuer-Lauridsen, F. (2009). NANOMATERIALS IN CONSUMER PRODUCTS Categorization and Exposure Assessment. *NANOMATERIALS: RISKS AND BENEFITS*.
- Hedrich, R. (2012). ION CHANNELS IN PLANTS. *Physiol Rev*, 92, 1777–1811. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2011>.—Since
- Hu, C., Wang, Q., Zhao, H., Wang, L., Guo, S., & Li, X. (2015). Ecotoxicological effects of graphene oxide on the protozoan *Euglena gracilis*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.040>
- Hu, X., Kang, J., Lu, K., Zhou, R., Mu, L., & Zhou, Q. (2014). Graphene oxide amplifies the phytotoxicity of arsenic in wheat. *Scientific Reports*, 4, 6122. <https://doi.org/10.1038/srep06122>
- Hu, X., Lu, K., Mu, L., Kang, J., & Zhou, Q. (2014). Interactions between graphene oxide and plant cells: Regulation of cell morphology, uptake, organelle damage, oxidative effects and metabolic disorders. *Carbon*, 80(1), 665–676. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.09.010>
- Hu, X., & Zhou, Q. (2013). Health and Ecosystem Risks of Graphene. *Chemical Reviews*, 113, 3815–3835. <https://doi.org/10.1021/cr300045n>
- Hu, X., & Zhou, Q. (2014). Novel hydrated graphene ribbon unexpectedly promotes aged seed germination and root differentiation. *Scientific Reports*, 4, 3782. <https://doi.org/10.1038/srep03782>
- Huertas, R., Rubio, L., Cagnac, O., Garcia-Sanchez, M. J., Alché, J. de D., Venema, K., ... Rodriguez-Rosales, M. P. (2013). The K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter LeNHX2 increases salt tolerance by improving K<sup>+</sup> homeostasis in transgenic tomato. *Plant, Cell & Environment*, 36(12), 2135–2149. <https://doi.org/10.1111/pce.12109>
- Jastrzębska, A. M., & Olszyna, A. R. (2015). The ecotoxicity of graphene family materials: current status, knowledge gaps and future needs. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(1), 40. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2817-0>
- Jos, F., Polit, B. U., Santamarina, P., Universitat, S., Activity, N., View, E. O., & Jos, F. (2009). Atlas de Anatomía Vegetal, (October). <https://doi.org/10.13140/2.1.4532.8168>

- Kaymakanova, M. (2009). Effect of Salinity on Germination and Seed Physiology in Bean ( *Phaseolus Vulgaris* L .). *Education*, 2818(January), 326–329. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818430>
- Khiew, P., Chiu, W., Tan, T., Radiman, S., Abd-Shukor, R., & Chia, C. H. (2011). *Capping effect of palm-oil based organometallic ligand towards the production of highly monodispersed nanostructured material. Palm Oil: Nutrition, Uses and Impacts.*
- Khodakovskaya, M. V, de Silva, K., Nedosekin, D. A., Dervishi, E., Biris, A. S., Shashkov, E. V, ... Zharov, V. P. (2011). Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1008856108>
- Krug, H. F., & Wick, P. (2011). Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(6), 1260–1278. <https://doi.org/10.1002/anie.201001037>
- Lai, F., Wissing, S. a, Müller, R. H., & Fadda, A. M. (2006). Artemisia arborescens L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. *AAPS PharmSciTech.* <https://doi.org/10.1208/pt070102>
- Lang, X., Hirata, A., Fujita, T., & Chen, M. (2011). Nanoporous metal/oxide hybrid electrodes for electrochemical supercapacitors. *Nat Nanotechnol.* <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.13>
- Lidén, G. (2011). The European commission tries to define nanomaterials. *Annals of Occupational Hygiene.* <https://doi.org/10.1093/annhyg/meq092>
- Lin, D., Tian, X., Wu, F., & Xing, B. (2010). Fate and Transport of Engineered Nanomaterials in the Environment. *Journal of Environment Quality*, 39(6), 1896. <https://doi.org/10.2134/jeq2009.0423>
- Lin, D., & Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150(2), 243–250.
- Lin, S., Reppert, J., Hu, Q., Hudson, J. S., Reid, M. L., Ratnikova, T. A., ... Ke, P. C. (2009). Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants. *Small*, 5(10), 1128–1132. <https://doi.org/10.1002/smll.200801556>
- Liu, Q., Chen, B., Wang, Q., Shi, X., Xiao, Z., Lin, J., & Fang, X. (2009). Carbon Nanotubes as Molecular Transporters for Walled Plant Cells. *Nano Letters*, 9(3), 1007–1010. <https://doi.org/10.1021/nl803083u>
- Ljubimova, J. Y., & Holler, E. (2012). Biocompatible nanopolymers: the next generation of breast cancer treatment? *Nanomedicine (London, England)*, 7(10), 1467–70. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.115>

- Llanes, A., Reinoso, H., & Luna, V. (2005). Germination and early growth of *Prosopis strombulifera* seedlings in different saline solutions. *World Journal of Agricultural Sciences*, 1 (2), 120–128.
- Loh, K. P., Bao, Q., Ang, P. K., & Yang, J. (2010). The chemistry of graphene. *Journal of Materials Chemistry*, 20(12), 2277. Retrieved from <http://xlink.rsc.org/?DOI=b920539j>
- López-Moreno, M. L., De La Rosa, G., Hernández-Viezcas, J. A., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2010). X-ray absorption spectroscopy (XAS) corroboration of the uptake and storage of ceo2 nanoparticles and assessment of their differential toxicity in four edible plant species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf904472e>
- Lozano-Isla, F., Alfaro Benites, O., Santana, D. G. de, Ranal, M., & Pompelli, M. F. (2015). GerminaQuant for R user manual.
- Maghsoudi Moud, A., & Maghsoudi, K. (2008). Salt Stress Effects on Respiration and Growth of Germinated Seeds of Different Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(3), 351–358.
- Maurer-Jones, M. A., Gunsolus, I. L., Murphy, C. J., & Haynes, C. L. (2013). Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Analytical Chemistry*, 85(6). <https://doi.org/10.1021/ac303636s>
- Méndez-Hurtado, A., Rangel-Méndez, R., Yáñez-Espinosa, L., & Flores, J. (2013). Tolerance to cadmium of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) seeds and seedlings from sites contaminated with heavy metals. *TheScientificWorldJournal*, 2013(3), 167834. <https://doi.org/10.1155/2013/167834>
- Miralles, P., Church, T. L., & Harris, A. T. (2012). Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants. *Environmental Science and Technology*.
- Miyamoto, S. Pingitore, N. E. (1992). Predicting calcium and magnesium precipitation in saline solutions following evaporation. *Soil Science Society Of America Journal*, 56(6), 1767–1775.
- Mogharabi, M., Abdollahi, M., & Faramarzi, M. A. (2014). Safety concerns to application of graphene compounds in pharmacy and medicine. *Daru : Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-22-23>
- Mukherjee, A., Majumdar, S., Servin, A. D., Pagano, L., Dhankher, O. P., & White, J. C. (2016). Carbon Nanomaterials in Agriculture: A Critical Review. *Frontiers in Plant Science*, 7, 172. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00172>
- Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y., & Kumar, D. S. (2010). Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.012>

- Noguchi, T., Sakai, A., & Hayashi, Y. (2014). *Atlas of Plant Cell Structure*. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-54941-3>
- Orth, E. S., Ferreira, J. G. L., Fonsaca, J. E. S., Blaskiewicz, S. F., Domingues, S. H., Dasgupta, A., ... Zarbin, A. J. G. (2016). pKa determination of graphene-like materials: Validating chemical functionalization. *Journal of Colloid and Interface Science*, *467*, 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.01.013>
- Ostrowski, A. D., Martin, T., Conti, J., Hurt, I., & Harthorn, B. H. (2009). Nanotoxicology: Characterizing the scientific literature, 2000-2007. *Journal of Nanoparticle Research*. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9579-5>
- Ranal, M. A., & Santana, D. G. de. (2006). How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica*, *29*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000100002>
- Ranjan, S., Dasgupta, N., & Lichtfouse, E. (2016). Sustainable Agriculture Reviews 20 Nanoscience in Food and Agriculture 1.
- Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2011). Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf104517j>
- Rios Del Toro, E. E., Celis Garcia, M. de L. B., Rangel Méndez, J. R., René, J., & Méndez, R. (2012). *Modificación Química de Fibras de Carbón Activado y su Aplicación en procesos de Óxido-Reducción*. IPICYT. Retrieved from <http://repositorio.ipicyt.edu.mx/bitstream/11627/95/1/RiosDelToro.pdf>
- Rizzello, L., & Pompa, P. P. (2014). Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: Mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines. *Chem. Soc. Rev.* <https://doi.org/10.1039/C3CS60218D>
- Rogala, M., Dabrowski, P., Kowalczyk, P. J., Wlasny, I., Kozłowski, W., Busiakiewicz, A., ... Klusek, Z. (2016). The observer effect in graphene oxide - How the standard measurements affect the chemical and electronic structure. *Carbon*, *103*, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.03.015>
- Safari, J., & Zarnegar, Z. (2014). Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *Journal of Saudi Chemical Society*. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.12.009>
- Safiuddin, M., Gonzalez, M., Cao, J., & Tighe, S. L. (2014). State-of-the-art report on use of nano-materials in concrete. *International Journal of Pavement Engineering*. <https://doi.org/10.1080/10298436.2014.893327>
- Seabra, A. B., Paula, A. J., de Lima, R., Alves, O. L., & Durán, N. (2014). Nanotoxicity of Graphene and Graphene Oxide. *Chemical Research in Toxicology*, *27*(2), 159–168. <https://doi.org/10.1021/tx400385x>

- Seemann, J. R., & Critchley, C. (1985). Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, *164*(2), 151–162. <https://doi.org/10.1007/BF00396077>
- Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., Firoz, M., & Al-Khaishany, M. Y. (2015). Role of Nanoparticles in Plants. In *Nanotechnology and Plant Sciences* (pp. 19–35). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0_2)
- Spisni, E., Seo, S., Joo, S. H., & Su, C. (2016). Release and toxicity comparison between industrial- and sunscreen-derived nano-ZnO particles. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1077-1>
- Stampoulis, D., Sinha, S. K., & White, J. C. (2009). Assay-Dependent Phytotoxicity of Nanoparticles to Plants. *Environmental Science & Technology*, *43*(24), 9473–9479. <https://doi.org/10.1021/es901695c>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology. Cell*. <https://doi.org/10.1104/pp.900074>
- Ulate Montero, G. (2013). Canales iónicos. *Bioelectricidad*, *75*, 87.
- Ulloa, J. A., Rosas Ulloa, P., Ramírez, C., Ramírez, J., & Ulloa Rangel, B. E. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente Año*, *3*(8), 5–9.
- United States Department of Agriculture. (2016). Classification | USDA PLANTS. Retrieved from <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=PHVU>
- US EPA. (1996). *USEPA Ecological Effects Test Guidelines (OPPTS 850.4200) Seed germination root elongation toxicity test*. Retrieved from [http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS\\_Harmonized/850\\_Ecological\\_Effects\\_Test\\_Guidelines/Drafts/850-4200.pdf](http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-4200.pdf)
- Winpenny, J., Heinz, I., & Koo-Oshima, S. (2013). *Reutilización del agua en la agricultura : ¿Beneficios para todos?* Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/017/i1629s/i1629s.pdf>
- Yang, K., & Ma, Y.-Q. (2010). Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. *Nature Nanotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.141>
- Ye, X., Gu, Y., & Wang, C. (2012). Fabrication of the Cu 2O/polyvinyl pyrrolidone-graphene modified glassy carbon-rotating disk electrode and its application for sensitive detection of herbicide paraquat. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *173*, 530–539.

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.07.047>

Zaytseva, O., & Neumann, G. (2016). Carbon nanomaterials: production, impact on plant development, agricultural and environmental applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 17.

<https://doi.org/10.1186/s40538-016-0070-8>

Zhang, L., & Fang, M. (2010). Nanomaterials in pollution trace detection and environmental improvement. *Nano Today*.

<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2010.03.002>

Zhang, L., Feng, C., Chen, Z., Liu, L., Jiang, K., Li, Q., & Fan, S. (2008). Superaligned carbon nanotube grid for high resolution transmission electron microscopy of nanomaterials. *Nano Lett.* <https://doi.org/10.1021/nl8012727>

Zhang, N., Ping, Q., Huang, G., Han, X., Cheng, Y., & Xu, W. (2006). Transport characteristics of wheat germ agglutinin-modified insulin-liposomes and solid lipid nanoparticles in a perfused rat intestinal model. *J. Nanosci. Nanotechnol.* <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.425>

Zhang, Y., Ali, S. F., Dervishi, E., Xu, Y., Li, Z., Casciano, D., & Biris, A. S. (2010). Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural phaeochromocytoma-derived pc12 cells. *ACS Nano*.

<https://doi.org/10.1021/nn1007176>

Zhu, Y., Murali, S., Cai, W., Li, X., Suk, J. W., Potts, J. R., & Ruoff, R. S. (2010). Graphene and graphene oxide: Synthesis, properties, and applications. *Advanced Materials*, 22(35), 3906–3924.

Zuccarini, P. (2008). Effects of silicon on photosynthesis, water relations and nutrient uptake of *Phaseolus vulgaris* under NaCl stress. *BIOLOGIA PLANTARUM*, 52(1), 157–160.