



## APLICACIÓN FOLIAR Y AL SUSTRATO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC Y ZN-EDTA SOBRE LA FISIOLOGÍA Y PRODUCCIÓN DE FRUTOS DE FRESA (*Fragaria x ananassa* Duch) †

[FOLIAR AND SUBSTRATE APPLICATION OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES AND ZN-EDTA ON THE PHYSIOLOGY AND PRODUCTION OF STRAWBERRY FRUITS (*Fragaria x ananassa* Duch)]

María Elena Loera-Alvarado<sup>1</sup>, Daniel Padilla-Chacón<sup>2\*</sup>,  
Alberto Enrique Becerril-Román<sup>1</sup>, Ciro Velasco-Cruz<sup>1</sup>,  
Hilda Araceli Zavaleta-Mancera<sup>1</sup> and Guillermo Calderón-Zavala<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km. 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. Email: loera.maria@colpos.mx, becerril@colpos.mx, cvelasco@colpos.mx, arazavaleta@colpos.mx, cazagu@colpos.mx.

<sup>2</sup>Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km. 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. Email: daniel.padilla@colpos.mx.

\*Corresponding author

### SUMMARY

**Background:** Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) are one of the most used nanomaterials as fertilization source and they have favorable results in growing and the whole development in several crops. However, their effects on the plant physiological processes are contradictory. **Objective:** To evaluate the physiological effects of the use of zinc oxide nanoparticles and two application methods on physiology and productivity in strawberry crop. **Methodology:** ZnO NPs (100, 200, 500, 1000 mg L<sup>-1</sup>) and Zn-EDTA through substrate and foliar way, using an increased factorial design completely randomized with four replicates per treatment. Gases interchange, foliar area, specific weight, quantum efficiency of photosystem II and fruit production were determined. **Results.** 200 mg L<sup>-1</sup> per foliar application increased the net assimilation rate by 34% compared to treatment with Zn-EDTA. These results were consistent with the 16% increase in leaf area per plant; however, it was shown that foliar application with 500 and 1000 mg L<sup>-1</sup> of nanoparticles affects the efficiency of photosystem II. **Implications:** These results provide knowledge about the physiological effect of zinc oxide nanoparticles applied as a fertilization source. **Conclusion:** The foliar application of 200 mg L<sup>-1</sup> of ZnO NPs proved to be the most efficient concentration to increase the net assimilation rate and leaf area. Chlorophyll fluorescence results indicated that the use of ZnO NPs at concentrations of 500 and 1000 mg L<sup>-1</sup> applied foliarly, affected the photochemical efficiency of photosystem II.

**Key words:** fertilization; application methods; photosynthesis; photosystem II.

### RESUMEN

**Antecedentes:** Las nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) se encuentran entre los nanomateriales más utilizados como fuente de fertilización con resultados favorables en el crecimiento y desarrollo de diversos cultivos; sin embargo, sus efectos sobre los procesos fisiológicos de las plantas son contradictorios. **Objetivo:** Evaluar los efectos fisiológicos por el uso de NPs ZnO y dos métodos de aplicación sobre la fisiología y productividad en el cultivo de fresa. **Metodología:** Se realizaron aplicaciones foliares y al sustrato con diferentes concentraciones de NPs ZnO (100, 200, 500, 1000 mg L<sup>-1</sup>) y Zn-EDTA, con un diseño factorial aumentado completamente al azar con cuatro réplicas por tratamiento. Se determinó intercambio gaseoso, área foliar, peso específico, eficiencia máxima fotoquímica del fotosistema II y producción de fruto. **Resultados:** La dosis con 200 mg L<sup>-1</sup> por aplicación foliar incrementó 34% la tasa de asimilación neta respecto al tratamiento con Zn-EDTA, estos resultados fueron consistentes con el incremento

† Submitted July 8, 2023 – Accepted July 25, 2024. <http://doi.org/10.56369/tsaes.5057>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = María Elena Loera-Alvarado: <http://orcid.org/0009-0000-2952-3591>; Daniel Padilla-Chacón: <http://orcid.org/0000-0001-9887-1063>; Alberto Enrique Becerril-Román: <http://orcid.org/0000-0001-9975-8492>; Ciro Velasco-Cruz: <http://orcid.org/0000-0003-0315-9511>; Hilda Araceli Zavaleta-Mancera: <http://orcid.org/0000-0003-1092-6299>; Guillermo Calderón-Zavala: <http://orcid.org/0000-0002-9649-2200>

de 16% de área foliar por planta. Se encontró que dosis de 500 y 1000 mg L<sup>-1</sup> afecta la eficiencia en el fotosistema II. **Implicaciones:** Los resultados obtenidos aportan conocimiento del efecto fisiológico de las nanopartículas de óxido de zinc aplicadas como una fuente de fertilización. **Conclusión:** La aplicación foliar de 200 mg L<sup>-1</sup> de NPs ZnO demostró ser la concentración más eficiente para aumentar la tasa de asimilación neta y el área foliar. Los resultados de fluorescencia de clorofila, indicaron que el uso de NPs ZnO a concentraciones de 500 y 1000 mg L<sup>-1</sup> aplicadas vía foliar, afectan la eficiencia fotoquímica del fotosistema II.

**Palabras clave:** fertilización; métodos de aplicación; fotosíntesis; fotosistema II.

## INTRODUCCIÓN

La nanotecnología surge como un campo emergente en la ciencia, con una gran diversidad de aplicaciones en electrónica, medicamentos, cosméticos, textiles, ciencia de los alimentos, sector energético y agricultura (Kataria *et al.*, 2019). En el sector agrícola, su uso consiste en la utilización de partículas de tamaño nanométrico como nutrientes para la planta con el objetivo de aumentar la eficiencia en el uso de los fertilizantes (Liu and Lal, 2015), entre las más empleadas, se encuentran las nanopartículas de hierro, cobre, óxido de zinc y selenio.

Particularmente, las nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) se encuentran entre los nanomateriales más utilizados en el sector agrícola, puesto que el óxido de zinc a escala nanométrica es un compuesto generalmente reconocido como seguro (GRAS por sus siglas en inglés) por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (Adhikari *et al.*, 2015). Además, diversos estudios demuestran que aplicaciones foliares o al suelo de NPs ZnO son efectivas para mejorar el crecimiento y desarrollo de los cultivos.

En plantas de jitomate, la aplicación foliar de 20 mg L<sup>-1</sup> de NPs ZnO incrementó el crecimiento y producción de biomasa seca (Panwar, 2012); similarmente, la aspersión de NPs ZnO aumentó la altura y biomasa seca en plantas de garbanzo (Burman, Saini and Kumar, 2013). (Yusefi-Tanha *et al.*, 2020) mencionan que el rendimiento de grano en soya se incrementó con la aplicación al suelo de 160 mg kg<sup>-1</sup> de NPs ZnO. Zhao *et al.* (2014) observaron incrementos en longitud y biomasa seca de la raíz en plantas de pepino con la incorporación al suelo de 400 y 800 mg kg<sup>-1</sup> de NPs ZnO.

No obstante, sus efectos sobre los aspectos fisiológicos de las plantas son contradictorios, algunos estudios señalan que el uso de NPs ZnO mejora la fisiología de los cultivos; por ejemplo, la tasa fotosintética neta se incrementó con aplicaciones foliares de NPs ZnO en tomate, café, arroz y maíz (Faizan *et al.*, 2018; Rossi *et al.*, 2019; Ali *et al.*, 2019; Salam *et al.*, 2022). Sin embargo, otros estudios mencionan que la aplicación de NPS ZnO afecta negativamente aspectos relacionados con la fisiología de la planta, como lo demuestra lo encontrado por Wang *et al.* (2016), que

observaron una disminución en las variables de intercambio gaseoso en plantas de *Arabidopsis*; así también, la aplicación de NPs ZnO (2000 mg L<sup>-1</sup>) afectó las emisiones de fluorescencia de clorofila y redujo la fotosíntesis en plantas de cebada (Rajput *et al.*, 2021). Es pues fundamental el monitoreo de las condiciones internas en que se encuentran las plantas para determinar si el uso de estas nanopartículas favorece o afecta el desarrollo del cultivo, toda vez que los procesos fisiológicos son determinantes en el crecimiento y la productividad (Kalaji *et al.*, 2014).

Las NPs ZnO debido a su tamaño nanométrico (menores a 100 nanómetros) poseen mayor superficie específica por unidad de volumen y por tanto mayor reactividad, respecto a partículas de mayor tamaño, lo cual produce cambios en sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Anu Mary Ealia and Saravanakumar, 2017). Estas propiedades han demostrado ser útiles para mejorar la producción de los cultivos, mediante su aplicación como fertilizante fuente del micronutriente zinc. Este micronutriente esencial participa en una gran cantidad de procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas, y su deficiencia reduce tanto el rendimiento como el valor nutricional de los cultivos (Amezcuca Romero and Lara Flores, 2017).

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) es uno de los cultivos de gran importancia alimenticia y económica a nivel mundial, sus frutos son de los más difundidos y aceptados debido a sus propiedades nutricionales y organolépticas (Liu, Zhang and Yang, 2018). Al ser una planta herbácea, de tamaño pequeño y ciclo de producción corto, es considerada un cultivo modelo, ya que permite un estudio detallado del crecimiento o respuestas de variables que se evalúan.

Bajo el contexto anterior, el objetivo de este estudio es evaluar los efectos de diferentes concentraciones de NPs ZnO y dos métodos de aplicación sobre las variables de intercambio gaseoso, área foliar, peso específico de hoja, fluorescencia de clorofila y productividad en el cultivo de fresa, partiendo de la hipótesis que la aplicación de NPs ZnO mejora la respuesta de variables fisiológicas, lo cual conlleva a un aumento en la productividad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización y condiciones experimentales

El estudio se desarrolló en el Campo Experimental Frutícola del Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados en Texcoco, Estado de México, México, del 14 de abril 2021 a marzo 2022, en un invernadero tipo capilla, con un recubrimiento de plástico lechoso con 25% de opacidad, superficie de 60 m<sup>2</sup>, sin climatización controlada. Las condiciones de temperatura media dentro del invernadero variaron entre 15 y 23°C.

### Material vegetal y establecimiento de las plantas

Las plantas de fresa utilizadas fueron de la selección 99.717, desarrollada en el INIFAP, provenientes de un vivero establecido en el mismo campo experimental; se usaron plantas hijas a raíz desnuda, con un diámetro de corona de 2 cm de diámetro y una longitud de raíz de 10 cm aproximadamente, las cuales fueron llevadas a invernadero donde se trasplantaron en bolsas de plástico con capacidad en volumen de 10 L, utilizando como sustrato una mezcla 2:2:1 de suelo, turba y agrolita, con pH de 5.9, conductividad eléctrica de 0.4 dS m<sup>-1</sup>, 33.1 % de materia orgánica. Se trasplantó una planta por bolsa con 2 kg de sustrato.

### Manejo del cultivo

Las plantas fueron regadas diariamente mediante riego por goteo, utilizando goteros autocompensantes, con emisores de 25 mL min<sup>-1</sup>, con un suministro de 1.5 L de agua diario por planta, se aplicó semanalmente 1.5 L de solución nutritiva Steiner (1984) al 50%, con una conductividad eléctrica de 1 dS m<sup>-1</sup> y pH de 5.5; la solución excluyó al zinc, y se mantuvo el balance de aniones y cationes. Se realizaron dos aplicaciones del fertilizante foliar LOBI® 44 (fertilizante foliar con una composición de 44 % en peso de nitrógeno sin biuret) para corregir deficiencia de nitrógeno, aplicadas durante el crecimiento vegetativo y floración.

### Diseño experimental y tratamientos

Se utilizó un diseño factorial aumentado completamente al azar con cuatro réplicas, donde los factores de estudio fueron: Método de aplicación (factor A), y concentraciones de NPs ZnO (factor B). Los niveles evaluados del factor A fueron: 1) aplicación foliar y 2) aplicación al sustrato; y 5 niveles del factor B: cuatro concentraciones de NPs ZnO (100, 200, 500 y 1000 mg L<sup>-1</sup>) y un tratamiento Zn-EDTA (2.5 ml L<sup>-1</sup> de agua), como fuente de fertilización convencional de zinc; el diseño factorial completo (2x5) se extendió para acomodar un nivel testigo, que consistió en no aplicar ninguna fuente de zinc,

obteniendo un factorial 2x5+1. Como unidad experimental se consideró una planta por maceta.

### Aplicación de tratamientos

Las soluciones con NPs ZnO se prepararon con agua desionizada y luego fueron sometidas a sonicación en un baño ultrasónico Bransonic® M1800 (50 Hz), por 30 minutos, en dos tiempos de 15 minutos. Para su aplicación se utilizó el coadyuvante comercial DAP PLUS (composición de 32% de peso de acidificantes y reguladores de pH orgánicos, 38% de polialcoholes y glicoles con acción dispersante, penetrante y antiespumante). La aplicación foliar de las NPs se realizó asperjando 30 mL de solución por planta y 30 mL para aplicar directamente al sustrato, dependiendo del tratamiento. En la aplicación del tratamiento con Zn-EDTA también se utilizó el coadyuvante y se aplicaron 30 mL de la solución por planta.

### Variables de estudio

#### Caracterización de las nanopartículas

Las NPs ZnO fueron proporcionadas por el Centro de Investigación de Química Aplicada (CIQA), Saltillo, Coahuila. Para su caracterización, las NPs ZnO se diluyeron en agua desionizada y se dispersaron en un ultrasonificador Bransonic® M1800 (50 Hz) por 15 minutos. Posteriormente, se agitaron en un vortex a 1000 rpm por un minuto e inmediatamente después se colocaron 5 µL de la suspensión sobre rejillas de cobre cubiertas con Formvar y carbón; dos rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (MET) (Tecnai 2 Spirit, Thermo Fisher Fei Company, USA), operado a 120 kV, en la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados. Se obtuvieron micrografías de las nanopartículas y con la aplicación ImageJ (versión 1.52p) se obtuvo el tamaño promedio.

#### Intercambio gaseoso

Las determinaciones de esta variable se realizaron en el foliolo central de una hoja madura joven completamente expandida y sana, en tres fechas fenológicas del cultivo (crecimiento vegetativo, floración y fructificación). Se utilizó un sistema portátil de fotosíntesis modelo LI-6200 (LI-COR inc; Lincoln, Nebraska, USA). Se registró la tasa de fotosíntesis (µmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), conductancia estomática (mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), transpiración (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y eficiencia en el uso del agua (µmol CO<sub>2</sub>/ mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Además de la concentración intercelular de CO<sub>2</sub> (µmol mol<sup>-1</sup>).

### Área foliar por planta

Se estimó al final del ciclo productivo, usando el equipo ScanalyzerPL (LemnaTec, Alemania), del laboratorio de Botánica del Colegio de Postgraduados. Para la medición, cada planta se colocó en la cabina de la plataforma iluminada con lámparas de luz blanca y se tomaron imágenes de dos ángulos de la planta con la cámara lateral en RGB (rojo, verde y azul), para distinguir el área foliar. La resolución de la cámara digital (Baster AG, Ahrensburg, Alemania) fue de  $1628 \times 1236$  píxeles utilizando luz en el espectro visible RGB (400-700 nm) con un tamaño de píxel de  $4.4 \mu\text{m} \times 4.4 \mu\text{m}$ . Las imágenes se exportaron al programa LemnaGrid para determinar el área foliar digital; posteriormente, con el programa ImageTool (Ver. 2.0, US, 1997) se obtuvo una aproximación del área foliar de la planta; los resultados se expresaron en  $\text{cm}^2$ .

### Peso específico de hoja (PEH)

Se realizaron tres mediciones en tres etapas fenológicas, expresadas como días después de trasplante (DDT): crecimiento vegetativo (105 DDT), floración (189 DDT) y fructificación (289 DDT). Se midió el área de tres hojas completas (nueve folíolos) de cada planta mediante un integrador de área foliar (LICOR, Modelo LI-3100; Lincoln, Nebraska, USA). Posteriormente, las hojas se secaron en una estufa con aire forzado, a una temperatura de  $70^\circ\text{C}$  por 72 horas y se obtuvo su peso seco con una balanza digital; con estos datos se calculó el  $\text{PEH} = \text{Peso seco (mg)}/\text{área foliar (cm}^2\text{)}$ .

### Eficiencia máxima fotoquímica potencial del fotosistema II (PSII)

Las mediciones se realizaron en folíolos completamente expandidos, separados de la planta 24 horas después de la aplicación de tratamientos. Las muestras foliares se colocaron en oscuridad durante 10 minutos, posteriormente se introdujeron en una cámara cerrada (PhotoSystem Instruments Open FluorCam FC800-0, República Checa), donde se expusieron a un flash actínico saturado de  $1800 \mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con el uso del fluorómetro de clorofila Imaging-PAM (Walz, Alemania). Se midió la fluorescencia del PSII basal ( $F_0$ ) y el nivel máximo de fluorescencia del PSII medido ( $F_m$ ), los cuales se usaron para calcular la eficiencia máxima fotoquímica potencial del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ), mediante la fórmula:  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$

### Producción de fruto por planta

Durante el periodo de cosecha, se tomó y se registró el peso de los frutos cosechados de cada una de las plantas muestreadas (g).

### Análisis estadístico

El efecto entre método de aplicación y concentraciones de NPs ZnO se analizó a través de modelos lineales generalizados mixtos (GLIMMIX). Posteriormente se realizó comparación de medias para controlar el problema de multiplicidad (Tukey  $P \leq 0.05$ ). Finalmente, para evaluar la correlación entre producción de frutos y las variables fisiológicas evaluadas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico SAS versión 9.4.

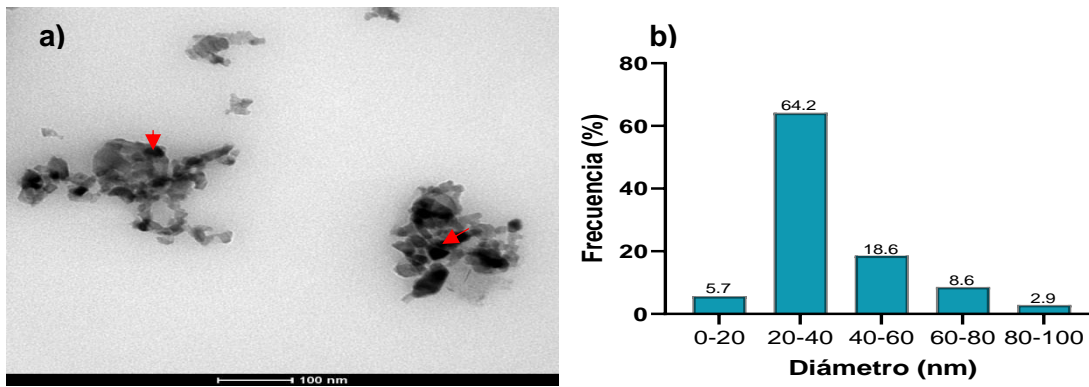
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de las nanopartículas

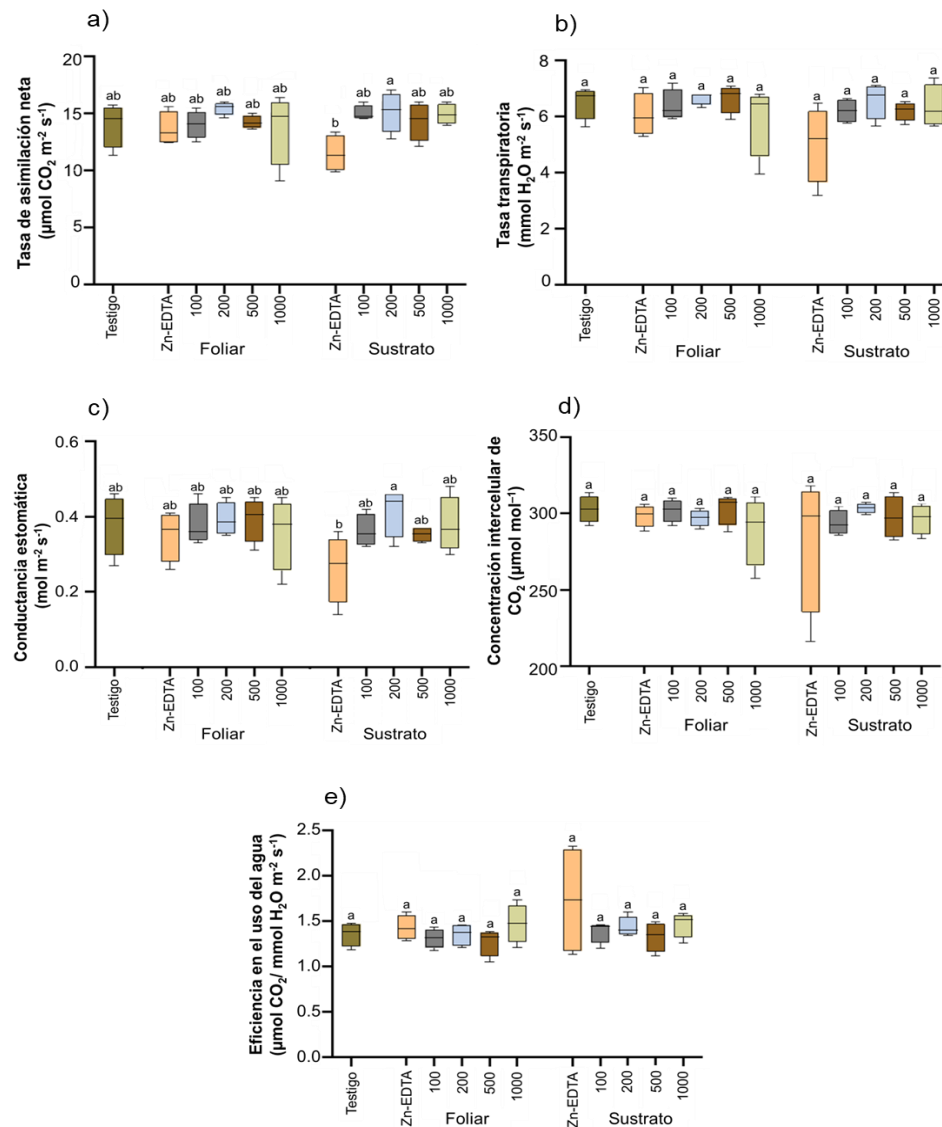
Según las observaciones con TEM las NPs ZnO presentaron una morfología poliédrica y el tamaño de la mayoría de las partículas ( $\sim 64\%$ ) fue de 20-40 nm (Figura 1).

### Intercambio gaseoso (IG)

Los resultados obtenidos de la tasa de fotosíntesis neta (TF) (a), tasa transpiratoria (TT) (b), conductancia estomática (CE) (c), concentración intercelular de  $\text{CO}_2$  (Ci) (d) y la eficiencia del uso del agua (EUA) (e) en crecimiento vegetativo se presentan en la Figura 2. Se encontraron diferencias significativas en TF con la aplicación de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de NPs ZnO al sustrato ( $15.45 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) en comparación con la aplicación comparación con Zn-EDTA por el mismo método de aplicación ( $11.48 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (Figura 2a). La TT osciló entre 5.02 y  $6.58 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; sin embargo, la comparación de medias no indicó diferencias estadísticas (Figura 2b). La CE tuvo un comportamiento similar a la transpiración debido a su estrecha relación, el tratamiento con el valor más alto ( $0.42 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) se obtuvo con la concentración de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de NPs ZnO aplicada al sustrato, mientras que el valor más bajo ( $0.26 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) fue causado por el tratamiento con Zn-EDTA, por el mismo método de aplicación; estos resultados son estadísticamente significativos (Figura 2c). Para Ci y la variable estimada como EUA no se encontraron diferencias significativas mediante comparación de medias, lo que indica que están menos predispuestos a la aplicación de zinc (Figura 2d, 2e). Para las etapas de floración y fructificación no se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos para IG (datos no mostrados).



**Figura 1.** Morfología y tamaño de NPs ZnO con Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). a) Imagen de NPs ZnO con TEM en campo claro. Las flechas rojas indican las nanopartículas en la escala de 100 nm. b). Histograma de distribución de frecuencias del tamaño de las nanopartículas. Las flechas rojas indican las nanopartículas en la escala de 100 nm.



**Figura 2.** Intercambio gaseoso en plantas de *Fragaria x ananassa* Duch. cultivadas bajo invernadero, tratadas con diferentes dosis de NPs ZnO vs Zn-EDTA aplicadas vía foliar y al sustrato. a) Tasa de asimilación neta, b) tasa de transpiración, c) conductancia estomática, d) concentración intercelular de CO<sub>2</sub> y e) eficiencia en el uso del agua. [Las dosis de NPs ZnO se expresan en mg L<sup>-1</sup> y Zn-EDTA en mL L<sup>-1</sup>. Las barras verticales representan el error estándar (n = 4). Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, P ≤ 0.05)].

El aumento de la tasa fotosintética con la concentración 200 mg L<sup>-1</sup> aplicada al sustrato, indicó que esta concentración mantiene la eficiencia fotosintética, ya que el suministro regular de Zn mantiene la permeabilidad de la membrana, la actividad en el tejido foliar, el contenido de clorofila y otros pigmentos fotosintéticos (Al Jabri *et al.*, 2022).

De igual forma, la tasa fotosintética neta se incrementó con la aplicación de 8 mg L<sup>-1</sup> de NPs ZnO en tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Faizan *et al.*, 2018). Así también, Ali *et al.* (2019) obtuvieron un incremento en la fotosíntesis en plantas de arroz, con la aspersión de 100 mg L<sup>-1</sup> de NPs ZnO. Rossi *et al.* (2019) mencionan que la tasa fotosintética neta en plantas de café, aumentó un 55% en respuesta al tratamiento con este tipo de nanopartículas comparado con el testigo.

En contraste, Zhao *et al.* (2014) observaron que en plantas de pepino las aplicaciones de NPs ZnO no tuvieron impacto en el crecimiento, el intercambio gaseoso y el contenido de clorofila. En otro experimento, la aplicación de NPs ZnO (2000 mg L<sup>-1</sup>) afectó las emisiones de fluorescencia de clorofila y redujo la actividad fotosintética de plantas de cebada (Rajput *et al.*, 2021).

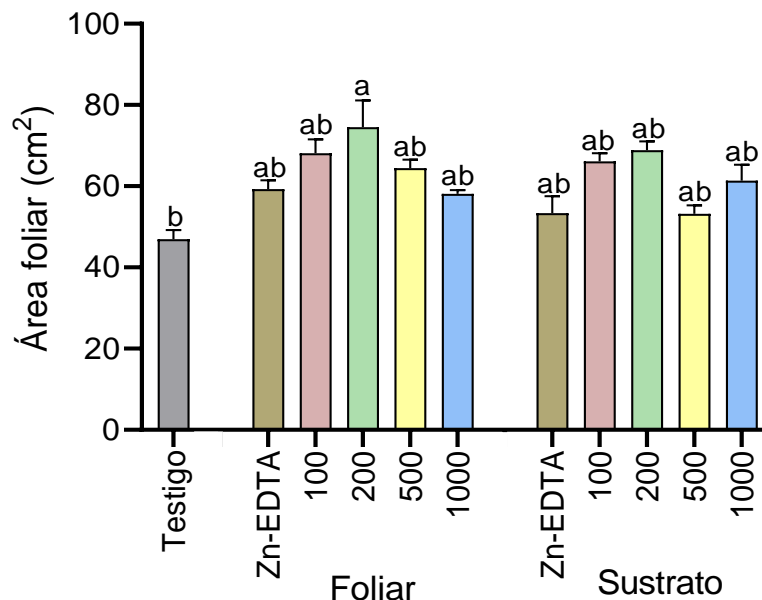
Si bien, el Zn es un micronutriente esencial en los cultivos y es necesario para la fotosíntesis, concentraciones altas (>1000 mg L<sup>-1</sup>) de NPs ZnO

pueden resultar fitotóxicas, debido a que se pueden liberar una gran cantidad de iones dentro de la planta (Wang *et al.*, 2018) y generar ERO (especies reactivas de oxígeno; ROS, Reactive Oxygen Species) (Wang *et al.*, 2016). Un exceso de Zn<sup>2+</sup> afecta la fotosíntesis al sustituir el Mg<sup>2+</sup> presente en la molécula de clorofila con Zn<sup>2+</sup>, inhibiendo su biosíntesis y, por ende, se reduce la producción de ATP (Adenosín Trifosfato) (Adhikari *et al.*, 2015).

Los resultados respecto a conductancia estomática revelaron que la aplicación de Zn-EDTA causaron cierre estomático; sin embargo, estos resultados muestran que no existe una relación concreta entre las NPs ZnO y esta variable en el cultivo de fresa, contrario a lo que reportaron varios estudios en diferentes cultivos, que señalan una mejora en los procesos fisiológicos de las plantas (Faizan *et al.*, 2018; Faizan y Hayat, 2020).

### Área foliar de la planta

Se observó un incremento en el área foliar de las plantas tratadas con NPs ZnO, tanto por el método de aplicación foliar como al sustrato; sin embargo, la comparación de medias, solamente indicó diferencias significativas con la aplicación de 200 mg L<sup>-1</sup> de NPs ZnO vía foliar (74.53 cm<sup>2</sup>), respecto al área foliar del tratamiento testigo (46.92 cm<sup>2</sup>) (Figura 3).



**Figura 3.** Área foliar de plantas de *Fragaria x ananassa* Duch. cultivadas bajo invernadero, tratadas con diferentes dosis de NPs ZnO vs Zn-EDTA aplicadas vía foliar y al sustrato. [Las dosis de NPs ZnO se expresan en mg L<sup>-1</sup> y Zn-EDTA en mL L<sup>-1</sup>. Las barras verticales representan el error estándar (n = 4). Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, P<0.05)].

El aumento en el área foliar con la aplicación foliar de 200 mg L<sup>-1</sup> de NPs ZnO tuvo mayor impacto sobre el crecimiento de las plantas de fresa, debido, probablemente, a una mayor posibilidad de absorción por la hoja, al tener menos aglomeración de partículas después de ser aplicado. Mientras que, aplicaciones al sustrato no tuvieron un efecto significativo, en razón del alto contenido de materia orgánica utilizado como sustrato en el experimento (M. O. 33.1%); los medios de cultivo con alto contenido de materia orgánica aumentan la adsorción de Zn (García-Gómez *et al.*, 2020).

El Zn actúa como cofactor de las enzimas responsables de la formación del triptófano, precursor de la síntesis de auxinas, por lo cual está involucrado en el alargamiento celular, lo que permite el aumento en el área foliar (Nithya *et al.*, 2018).

Saini *et al.* (2021) encontraron un incremento en el área foliar en plantas de fresa, mediante aplicaciones foliares de NPs ZnO. En otro estudio, la aplicación foliar con NPs de ZnO aumentó el área foliar total de plantas de tomate (Faizan *et al.*, 2018). Awan *et al.* (2021) informaron un aumento del 24% en el área foliar, cuando semillas de brócoli fueron tratadas con NPs ZnO.

### Peso específico de hoja (PEH)

El PEH varió poco con el tiempo de producción de la hoja y no fue afectado significativamente en ninguna etapa fenológica por los tratamientos evaluados. El valor máximo de PEH sucedió en la etapa de

crecimiento vegetativo para cada uno de los tratamientos, lo cual indica que es en esta etapa donde alcanzaron su máxima expansión laminar (Tabla 1).

Reyes-Santamaría *et al.* (2000) mencionan que el peso específico es un indicador de una tasa fotosintética potencial o que la lámina foliar es más eficiente. En fresa es un indicador de características anatómicas y fisiológicas (Jurik, Chabot and Chabot, 1982).

### Eficiencia máxima fotoquímica potencial del fotosistema II

Los cambios en las imágenes de fluorescencia, representadas por intensidades de color (donde el color rojo indica una mayor emisión de fluorescencia y el color verde indica un estado óptimo en la hoja) revelan que la intensidad de la fluorescencia aumenta dependiente de la concentración de NPs ZnO aplicada foliarmente (Figura 4).

Respecto a los valores calculados de eficiencia máxima fotoquímica potencial del fotosistema II (relación Fv/Fm), se observó que la eficiencia máxima fotoquímica potencial del fotosistema II fue menor en los tratamientos con nanopartículas en comparación con el testigo (0.825) y, este efecto se magnificó al aumentar la concentración, tal cual indican las diferencias significativas entre el testigo y la aplicación foliar con 500 y 1000 mg L<sup>-1</sup> de NPs ZnO, que promueven una reducción significativa de Fv/Fm (Figura 5).

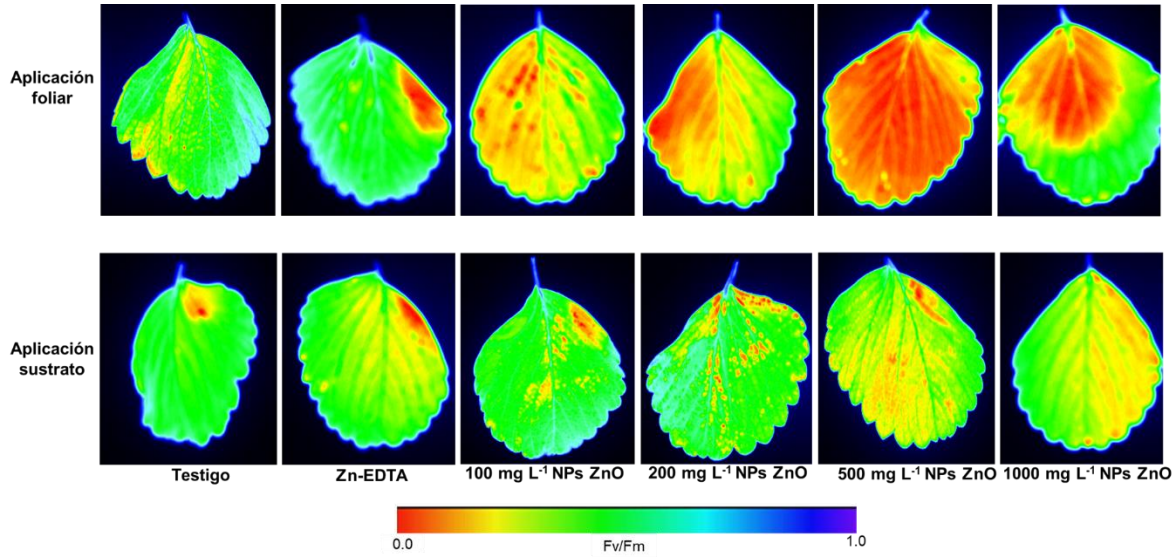
**Tabla 1. Peso específico de hoja en tres etapas fenológicas del cultivo de fresa, bajo condiciones de invernadero, y aplicaciones de NPs ZnO y Zn-EDTA.**

Aplicación	Tratamiento	Crecimiento vegetativo <sup>1</sup> (mg cm <sup>-2</sup> )	Floración <sup>1</sup> (mg cm <sup>-2</sup> )	Fructificación <sup>1</sup> (mg cm <sup>-2</sup> )
Foliar	Testigo	<sup>2</sup> 9.58 ± 0.47a <sup>1</sup>	8.80±0.24a	9.49 ±0.20a
	Zn-EDTA mL L <sup>-1</sup>	9.96±0.37a	8.94±0.30a	9.72±0.23 <sup>a</sup>
	100 mg L <sup>-1</sup>	10.09 ±0.33a	9.25±0.15a	9.85±0.22a
	200 mg L <sup>-1</sup>	10.63±0.81a	9.65±0.35a	9.93±0.25a
	500 mg L <sup>-1</sup>	10.17±0.34a	9.32±0.25a	9.89±0.23a
Sustrato	1000 mg L <sup>-1</sup>	9.65±0.30a	9.13±0.15a	9.81±0.28a
	Zn-EDTA mL L <sup>-1</sup>	9.94±0.23a	9.06±0.32a	9.38±0.24a
	100 mg L <sup>-1</sup>	10.09±0.23a	9.63±0.29a	9.77±0.25a
	200 mg L <sup>-1</sup>	10.12±0.28a	9.17±0.14a	10.07±0.22a
	500 mg L <sup>-1</sup>	9.69±0.16a	9.08±0.41a	9.62±0.50a
	1000 mg L <sup>-1</sup>	9.96±0.52a	9.10±0.32a	9.85±0.10a

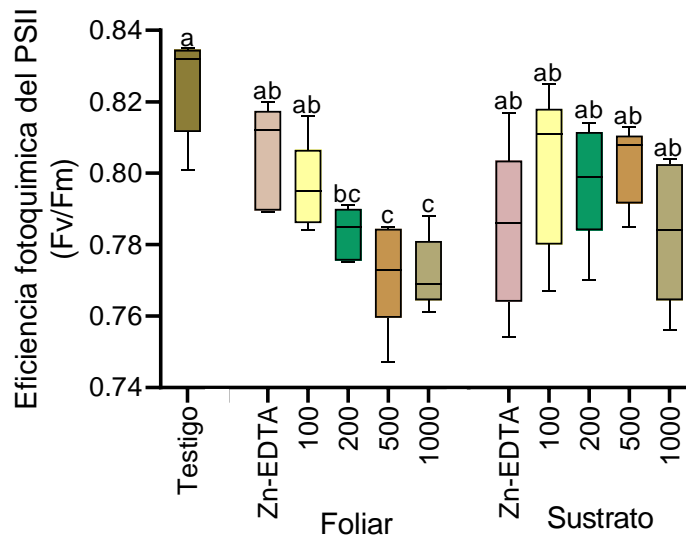
<sup>1</sup>Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales (Tukey, P≤0.05).

<sup>2</sup>Los valores son medias ± error estándar.





**Figura 4.** Imágenes de intensidad de fluorescencia de clorofila en hojas de *Fragaria x ananassa* Duch. cultivadas bajo invernadero, tratadas con diferentes dosis de NPs ZnO vs Zn-EDTA aplicadas vía foliar y al sustrato. (Las dosis de Zn-EDTA se expresan en mL L<sup>-1</sup>).



**Figura 5.** Eficiencia fotoquímica del PSII en hojas de *Fragaria x ananassa* Duch. cultivadas bajo invernadero, tratadas con diferentes dosis de NPs ZnO vs Zn-EDTA aplicadas vía foliar o al sustrato. [Las dosis de NPs ZnO se expresan en mg L<sup>-1</sup> y Zn-EDTA en mL L<sup>-1</sup>. Las barras verticales representan el error estándar (n = 4). Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, P ≤ 0.05)].

Percival (2004) menciona que valores de Fv/Fm en el rango de 0.78 a 0.85 se relacionan con plantas sanas y no estresadas. Los valores de Fv/Fm obtenidos por la aplicación foliar con 500 y 1000 mg L<sup>-1</sup> de NPs ZnO, ratifican que altas concentraciones de NPs ZnO reducen la eficiencia fotoquímica del PSII a niveles inferiores a 0.78, en cuyo caso las plantas se estresan. Una reducción en el funcionamiento del fotosistema II afecta al receptor inicial de la cadena de transporte de

electrones, ocasionando que la producción de NADPH y ATP disminuya y cause un daño en el aparato fotosintético (Wang *et al.*, 2016).

En tomate se ha demostrado que las aplicaciones de NPs ZnO reducen la eficiencia fotosintética y algunos otros parámetros de fluorescencia de clorofila, dependiente de la concentración (Wang *et al.*, 2018). De manera similar, Rajput *et al.*, (2021) encontraron



una relación significativa entre la concentración de NPs ZnO y la emisión de fluorescencia de la clorofila en cebada.

### Producción de fruto

La producción de fruto de plantas tratadas con 200 mg L<sup>-1</sup> de NPs de ZnO vía foliar es significativamente diferentes (687 g por planta), en comparación con las plantas tratadas con Zn-EDTA aplicado foliarmente (265 g por planta) (Figura 6).

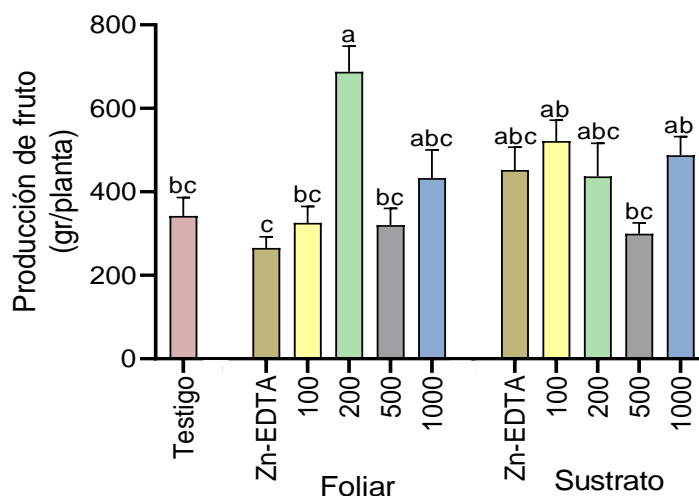
Estos resultados pueden deberse a que aplicaciones de zinc incrementan el área foliar, el contenido de clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, así como la tasa fotosintética de los cultivos, lo que conlleva en un mejor crecimiento y producción (Yang *et al.*, 2014). Además, este elemento en tamaño nanométrico tienen mayor superficie específica, facilitando la capacidad de penetración y transporte en la planta (Prasad *et al.*, 2012), promoviendo una mayor asimilación, lo que eventualmente conduce a una mejora en el

metabolismo de la planta y aumento en crecimiento, lo cual conlleva a una mayor producción de frutos (Navarro *et al.*, 2008).

Faizan *et al.* (2021) encontraron que aplicaciones foliares con 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs ZnO incrementan el rendimiento de tomate. Nithya *et al.* (2018) indicaron que aplicaciones foliares con 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs ZnO aumenta el rendimiento de mora. Resultados similares se obtuvieron en cacahuete, mijo y melón (Prasad *et al.*, 2012; Tarafdar *et al.*, 2014; Rivera-Gutiérrez *et al.*, 2021).

### Correlación entre producción de fruto y variables relacionadas con la fisiología

De acuerdo con el análisis de correlación de Pearson, la producción de fruto observa una correlación negativa con la relación Fv/Fm; mientras que la tasa fotosintética, como era de esperarse, se correlaciona positivamente con conductancia estomática (Tabla 2).



**Figura 6.** Producción de frutos de *Fragaria x ananassa* Duch cultivadas bajo invernadero, tratadas con diferentes dosis de NPs ZnO vs Zn-EDTA aplicadas vía foliar y al sustrato. [Las dosis de NPs ZnO se expresan en mg L<sup>-1</sup> y Zn-EDTA en mL L<sup>-1</sup>. Las barras verticales representan el error estándar (n = 4). Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, P≤0.05)].

**Tabla 2. Coeficientes de correlación entre producción de fruto y parámetros fisiológicos en plantas de fresa.**

Índice	Producción fruto	Tasa fotosintética	Conductancia estomática	Fv/Fm	PEH
Producción fruto	1.000				
Tasa fotosintética	0.184	1.000			
Conductancia estomática	0.171	0.725*	1.000		
Fv/Fm	-0.300*	-0.014	-0.054	1.000	
PEH	0.025	0.020	0.101	0.123	1.000

\*Correlaciones significativas al 5% utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

Fv/FM=Eficiencia fotoquímica del fotosistema II.

PEH=Peso específico de hoja.

## CONCLUSIÓN

La aplicación de 200 mg L<sup>-1</sup> de NPs ZnO al sustrato incrementó la tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub>; mientras que, la dosis de 200 mg L<sup>-1</sup> aplicada vía foliar incrementó el área foliar y la producción de fruto en el cultivo de fresa, superando a las aplicaciones de Zn EDTA y dosis de NPs aplicadas al sustrato. Los resultados de fluorescencia de clorofila, indicaron que el uso de NPs ZnO en concentraciones de 500 y 1000 mg L<sup>-1</sup> aplicadas vía foliar, reducen la eficiencia fotoquímica del fotosistema II. Se demuestra que el uso de NPs ZnO en bajas concentraciones puede mejorar la fisiología y productividad del cultivo de la fresa, por lo que puede ser una alternativa de fertilización que sustituya las fuentes convencionales de zinc.

### Acknowledgements

The authors thank CONAHCYT for the scholarship support granted to María Elena Loera Alvarado for the development of her doctoral studies.

**Funding.** This research was supported by the Postgraduate College in collaboration with the CONAHCYT-Mexico National Scholarship Program.

**Conflict of interests.** The authors declare that they have no conflict of interest in carrying out the research work from which they derived the data used.

**Compliance with ethical standards.** Due to the nature of this work, it does not require approval by any ethical committee.

**Data availability.** Data is available with <María Elena Loera Alvarado (loera.maria@colpos.mx)> upon reasonable request.

### Author contribution statement (CRediT) M.E.

**Loera-Alvarado** -Conceptualization, formal analysis and writing original draft., **D. Padilla-Chacon** - Writing, review and editing, validation, and supervision., **A.E. Becerril-Roman** - Conceptualization and writing-review, validation, and supervision., **C. Velasco-Cruz** – Conceptualization and formal analysis., **H.A. Zavaleta-Mancera** - Writing-review & editing., **G. Calderon-Zavala** - Writing, review and editing.

## REFERENCES

Adhikari, T., Kundu, S., Biswas, A.K., Tarafdar, J.C. and Subba Rao, A., 2015. Characterization of Zinc Oxide Nano Particles and Their Effect on Growth of Maize (*Zea mays* L.) Plant. *Journal of Plant Nutrition*, 38(10), pp.1505–1515.

<https://doi.org/10.1080/01904167.2014.992536>

Al Jabri, H., Saleem, M.H., Rizwan, M., Hussain, I., Usman, K. and Alsafran, M., 2022. Zinc Oxide Nanoparticles and Their Biosynthesis: Overview. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(4), p.594. <https://doi.org/10.3390/life12040594>

Ali, S., Rizwan, M., Noureen, S., Anwar, S., Ali, B., Naveed, M., Abd Allah, E.F., Alqarawi, A.A. and Ahmad, P., 2019. Combined use of biochar and zinc oxide nanoparticle foliar spray improved the plant growth and decreased the cadmium accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) plant. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(11), pp.11288–11299. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04554-y>

Amezcuca Romero, J.C. and Lara Flores, M., 2017. El zinc en las plantas. *Ciencia - Academia Mexicana de Ciencias*, 68(3), pp.28–35.

Anu Mary Ealia, S. and Saravanakumar, M.P., 2017. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263, p.032019. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>

Awan, S., Shahzadi, K., Javad, S., Tariq, A., Ahmad, A. and Ilyas, S., 2021. A preliminary study of influence of zinc oxide nanoparticles on growth parameters of *Brassica oleracea var italic*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 20(1), pp.18–24. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2020.10.003>

Burman, U., Saini, M. and Kumar, P., 2013. Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95(4), pp.605–612. <https://doi.org/10.1080/02772248.2013.803796>

Faizan, M., Bhat, J.A., Chen, C., Alyemeni, M.N., Wijaya, L., Ahmad, P. and Yu, F., 2021. Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) induce salt tolerance by improving the antioxidant system and photosynthetic machinery in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 161, pp.122–130. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.002>

- Faizan, M., Faraz, A., Yusuf, M., Khan, S.T. and Hayat, S., 2018. Zinc oxide nanoparticle-mediated changes in photosynthetic efficiency and antioxidant system of tomato plants. *Photosynthetica*, 56(2), pp.678–686. <https://doi.org/10.1007/s11099-017-0717-0>
- García-Gómez, C., García-Gutiérrez, S., Obrador, A. and Fernández, M.D., 2020. Study of Zn availability, uptake, and effects on earthworms of zinc oxide nanoparticle versus bulk applied to two agricultural soils: Acidic and calcareous. *Chemosphere*, 239, p.124814. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124814>
- Jurik, T.W., Chabot, J.F. and Chabot, B.F., 1982. Effects of Light and Nutrients on Leaf Size, CO<sub>2</sub> Exchange, and Anatomy in Wild Strawberry (*Fragaria virginiana*). *Plant Physiology*, 70(4), pp.1044–1048.
- Kalaji, H.M., Schansker, G., Ladle, R.J., Goltsev, V., Bosa, K., Allakhverdiev, S.I., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Dąbrowski, P., Elsheery, N.I., Ferroni, L., Guidi, L., Hogewoning, S.W., Jajoo, A., Misra, A.N., Nebauer, S.G., Pancaldi, S., Penella, C., Poli, D., Pollastrini, M., Romanowska-Duda, Z.B., Rutkowska, B., Serôdio, J., Suresh, K., Szulc, W., Tambussi, E., Yannicari, M. and Zivcak, M., 2014. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis Research*, 122(2), pp.121–158. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0024-6>
- Kataria, S., Jain, M., Rastogi, A., Živčák, M., Brestic, M., Liu, S. and Tripathi, D.K., 2019. Chapter 6 - Role of Nanoparticles on Photosynthesis: Avenues and Applications. In: D.K. Tripathi, P. Ahmad, S. Sharma, D.K. Chauhan and N.K. Dubey, eds. *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms*. [online] Academic Press. pp.103–127. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811488-9.00006-8>
- Liu, R. and Lal, R., 2015. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *The Science of the Total Environment*, 514, pp.131–139. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.104>
- Liu, Z., Zhang, M. and Yang, C., 2018. Dual extrusion 3D printing of mashed potatoes/strawberry juice gel. *LWT*, 96, pp.589–596. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.014>
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P.H. and Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17(5), pp.372–386. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>
- Panwar, J., 2012. Positive effect of zinc oxide nanoparticles on tomato plants: A step towards developing nano-fertilizers. [online] Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/Positive-effect-of-zinc-oxide-nanoparticles-on-A-Panwar/6b9a1be59474254906c6fbd3275bca9d0014acf> [Accessed 7 July 2023].
- Rajput, V.D., Minkina, T., Fedorenko, A., Chernikova, N., Hassan, T., Mandzhieva, S., Sushkova, S., Lysenko, V., Soldatov, M.A. and Burachevskaya, M., 2021. Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Physiological and Anatomical Indices in Spring Barley Tissues. *Nanomaterials*, 11(7), p.1722. <https://doi.org/10.3390/nano11071722>
- Reyes-Santamaría, M.I., Villegas-Monter, Á., Colinas-León, M.T. and Calderón-Zavala, G., 2000. Peso específico, contenido de proteína y de clorofila en hojas de naranjo y tangerino. *Agrociencia*, 34(1), pp.49–56.
- Rivera-Gutiérrez, R.G., Preciado-Rangel, P., Fortis-Hernández, M., Betancourt-Galindo, R., Yescas-Coronado, P., Orozco-Vidal, J.A., Rivera-Gutiérrez, R.G., Preciado-Rangel, P., Fortis-Hernández, M., Betancourt-Galindo, R., Yescas-Coronado, P. and Orozco-Vidal, J.A., 2021. Zinc oxide nanoparticles and their effect on melon yield and quality. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(5), pp.791–803. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i5.2987>
- Rossi, L., Fedenia, L.N., Sharifan, H., Ma, X. and Lombardini, L., 2019. Effects of foliar application of zinc sulfate and zinc nanoparticles in coffee (*Coffea arabica* L.) plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135, pp.160–166. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.12.005>
- Saini, S., Kumar, P., Sharma, N.C., Sharma, N. and Balachandar, D., 2021. Nano-enabled Zn fertilization against conventional Zn

- analogues in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Scientia Horticulturae*, 282, p.110016.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110016>
- Salam, A., Khan, A.R., Liu, L., Yang, S., Azhar, W., Ulhassan, Z., Zeeshan, M., Wu, J., Fan, X. and Gan, Y., 2022. Seed priming with zinc oxide nanoparticles downplayed ultrastructural damage and improved photosynthetic apparatus in maize under cobalt stress. *Journal of Hazardous Materials*, 423, p.127021.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127021>
- Tarafdar, J.C., Raliya, R., Mahawar, H. and Rathore, I., 2014. Development of Zinc Nanofertilizer to Enhance Crop Production in Pearl Millet (*Pennisetum americanum*). *Agricultural Research*, 3(3), pp.257–262.  
<https://doi.org/10.1007/s40003-014-0113-y>
- Wang, X., Yang, X., Chen, S., Li, Q., Wang, W., Hou, C., Gao, X., Wang, L. and Wang, S., 2016. Zinc Oxide Nanoparticles Affect Biomass Accumulation and Photosynthesis in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, [online] 6, p.1243.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01243>
- Wang, X.P., Li, Q.Q., Pei, Z.M. and Wang, S.C., 2018. Effects of zinc oxide nanoparticles on the growth, photosynthetic traits, and antioxidative enzymes in tomato plants. *Biologia Plantarum*, 62(4), pp.801–808.  
<https://doi.org/10.1007/s10535-018-0813-4>
- Yang, W., Wang, Y., Zhao, F., Ding, Z., Zhang, X., Zhu, Z. and Yang, X., 2014. Variation in copper and zinc tolerance and accumulation in 12 willow clones: implications for phytoextraction. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 15(9), pp.788–800.  
<https://doi.org/10.1631/jzus.B1400029>
- Yusefi-Tanha, E., Fallah, S., Rostamnejadi, A. and Pokhrel, L.R., 2020. Zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) as a novel nanofertilizer: Influence on seed yield and antioxidant defense system in soil grown soybean (*Glycine max* cv. Kowsar). *Science of The Total Environment*, 738, p.140240.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140240>
- Zhao, L., Peralta-Videa, J.R., Rico, C.M., Hernandez-Viezcas, J.A., Sun, Y., Niu, G., Servin, A., Nunez, J.E., Duarte-Gardea, M. and Gardea-Torresdey, J.L., 2014. CeO<sub>2</sub> and ZnO Nanoparticles Change the Nutritional Qualities of Cucumber (*Cucumis sativus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(13), pp.2752–2759.  
<https://doi.org/10.1021/jf405476u>