

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Asimilación integrada de carbono y nitrógeno bajo aplicación de dióxido de cloro y nano Zn-Mo en plantas de frijol

Integrated carbon and nitrogen assimilation under chlorine dioxide and nano Zn-Mo application in bean plants

Authors/Autores: Ramírez-Estrada, C.A., Rábago-González, Y., Sánchez-Chávez, E., Palacio-Márquez, A., Pérez-Álvarez, S., Rivas-Lucero, B.A.

ID: e1896

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1896>

Received/Fecha de recepción: May 30th 2025

Accepted /Fecha de aceptación: December 13th 2025

Available online/Fecha de publicación: January 26th 2026

Please cite this article as/Como citar este artículo: Ramírez-Estrada, C.A., Rábago-González, Y., Sánchez-Chávez, E., Palacio-Márquez, A., Pérez-Álvarez, S., Rivas-Lucero, B.A. (2025). Integrated carbon and nitrogen assimilation under chlorine dioxide and nano Zn-Mo application in bean plants. *Revista Bio Ciencias*, 13, e1896. <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1896>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

Artículo original

Asimilación integrada de carbono y nitrógeno bajo aplicación de dióxido de cloro y nano Zn-Mo en plantas de frijol

Integrated carbon and nitrogen assimilation under chlorine dioxide and nano Zn-Mo application in bean plants

ClO₂ and nano-Zn-Mo application /

ClO₂ and nano-Zn-Mo application

Ramírez Estrada, C.A.¹, Rábago González, Y.², Sánchez Chávez, E.*¹, Palacio Márquez, A.², Pérez Álvarez, S.², Rivas Lucero, B.A.²

¹Laboratorio de Fisiología y Nutrición Vegetal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Av. Cuarta Sur 3820, Fracc. Vencedores del Desierto, C.P. 33000, Cd. Delicias, Chih. México.

²Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, Universidad Autónoma de Chihuahua, Km 2.5 Carretera Delicias a Rosales, C.P. 33000, Cd. Delicias, Chih. México.

*Corresponding Author:

Esteban Sánchez-Chávez, Laboratorio de Fisiología y Nutrición Vegetal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Av. Cuarta Sur 3820, Fracc. Vencedores del Desierto, C.P. 33000, Cd. Delicias, Chih. México. E-mail: esteban@ciad.mx

RESUMEN

La producción de alimentos de forma sustentable es un reto para la agricultura moderna. Una alternativa para incrementar el rendimiento de los cultivos es la utilización de nanofertilizantes y aspersiones foliares con micronutrientes. Combinaciones de nano Zn y Mo, así como el dióxido de cloro (ClO₂), han mostrado resultados favorables. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la aplicación foliar de nano Zn-Mo y ClO₂ sobre la asimilación de nitrógeno, carbono y su relación con el rendimiento de plantas de frijol. Plantas de frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) cv Strike se desarrollaron durante 53 días. Se compararon la aplicación de ClO₂ a 30 ppm, nano Zn-Mo a 4 ppm y un control sin aplicación. La aplicación de nano Zn-Mo incrementó biomasa, rendimiento, índice de clorofila, aminoácidos solubles, clorofila total y sacarosa. La aplicación de ClO₂, favoreció la biomasa y la tasa fotosintética. Finalmente, los resultados sugieren que la asimilación de carbono está integrada a la asimilación de nitrógeno y que la aplicación foliar de nano Zn-Mo podría tener la capacidad de impulsar ambos metabolismos y mejorar el rendimiento en plantas de frijol ejotero.

PALABRAS CLAVE:

Phaseolus vulgaris L.; asimilación de amonio; productividad, fotosíntesis, nitrato reductasa.

ABSTRACT

Sustainable food production is a challenge for modern agriculture. An alternative to increase crop yields is the use of fertilizers that allow a reduction of inputs such as nanofertilizers and foliar sprays with nutrients in gas form. Combinations of nano Zn and Mo, as well as chlorine dioxide (ClO_2), have shown favorable results. However, information on the use of Zn and Mo nanofertilizers and ClO_2 , and their effects on primary metabolism and yield in bean plants, is scarce. Therefore, the objective of the present study was to determine the effect of foliar application of nano Zn-Mo and ClO_2 on nitrogen and carbon assimilation and their relationship with bean plant yield. Bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike were grown for 53 days. The application of ClO_2 at 30 ppm, nano Zn-Mo at 4 ppm, and a control without application were compared. The application of nano Zn-Mo increased biomass, yield, chlorophyll index, soluble amino acids, total chlorophyll, and sucrose. The application of ClO_2 favored biomass, photosynthetic rate, and electron transport rate. Finally, the results suggest that carbon assimilation is integrated with nitrogen assimilation, and that foliar application of nano Zn-Mo could boost both metabolisms and improve yield in bean plants.

KEY WORDS

Phaseolus vulgaris L., ammonium assimilation, productivity, photosynthesis, nitrate reductase.

Introducción

El frijol es la leguminosa más importante para la dieta a nivel mundial, sobre todo en países en desarrollo, debido a su contenido de proteínas, vitaminas, minerales y fibra. Sin embargo, la inseguridad alimentaria y la baja producción agrícola provocan malnutrición y otros problemas de salud pública (Qaim, 2020). Además, se estima que para 2050, la población mundial alcance los 10 mil millones y la superficie disponible para siembra se reduzca a un tercio (Pardey *et al.*, 2014). Dicho esto, la creciente demanda de producción puede satisfacerse con sistemas de intensificación. Es decir, incrementar el uso de fertilizantes, insumos como pesticidas y agua (Alexander *et al.*, 2015). No obstante, esto resultaría en mayor emisión de gases de efecto invernadero, deterioro de suelos y calidad de agua y pérdida en la biodiversidad. Por lo tanto, producir alimentos suficientes de forma sustentable es un reto prioritario para la agricultura moderna (Govindan, 2018).

Una alternativa viable para incrementar el rendimiento de los cultivos es la utilización de fertilizantes que permitan una reducción de insumos como los nanofertilizantes (Singh, 2017). Por su tamaño de partícula (1-100 nm), estos permiten una entrega y liberación más eficaz de los nutrientes a las plantas. Así mismo, la calidad de los recursos como el suelo y agua se mantiene debido a que se reducen las pérdidas de compuestos no absorbidos (Al-Mamun *et al.*, 2021). Diversos autores han reportado resultados favorables en cuanto a la germinación de semillas, crecimiento y producción en plantas mediante el uso de nanoformulaciones de Cu, Mn, Mo, Zn, Fe y Si (Subramanian *et al.*, 2015).

Otra de las alternativas que se han explorado es el uso de compuestos con la capacidad física para facilitar la absorción por parte de las plantas, como el dióxido de cloro (ClO_2). El ClO_2 es un gas sintético de color amarillo utilizado como desinfectante y como tratamiento postcosecha. Además, cuenta con la capacidad de inactivar células patógenas adheridas a partes inaccesibles de la planta y es eficaz y con un tiempo de tratamiento corto a bajas concentraciones (Sun *et al.*, 2019). Está catalogado como un producto seguro con restricciones, cuyos efectos residuales son menores y su aplicación no requiere de cuidados especiales, debido a las bajas concentraciones en las que es utilizado.

Por otro lado, los procesos de asimilación del carbono (C) y nitrógeno (N) son clave para el crecimiento y desarrollo de las plantas. El N es necesario para formar aminoácidos, clorofila y fitohormas. Por su parte, el C aporta agentes reductores, energía celular y esqueletos de carbono para integrar el N asimilado. (Bloom *et al.*, 2015). De este modo, existe una estrecha interacción entre estas vías y su coordinación es vital para la relación fuente-sumidero y la producción. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la aplicación foliar del nano fertilizante Zn-Mo a 4 ppm y ClO_2 a 30 ppm sobre la asimilación de nitrógeno, carbono y su relación con el rendimiento de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Material y Métodos

Manejo del cultivo

El experimento se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, en Cd. Delicias, Chihuahua, México, durante los meses de septiembre y octubre de 2022, bajo condiciones de malla sombra. Se utilizaron plantas de frijol ejotero cv. Strike. Se desarrollaron dos plantas sobre macetas de plástico de 13 L llenas con vermiculita y perlita en una proporción 2:1 (v/v). Durante el experimento, las plantas se irrigaron con una solución nutritiva estándar Hoagland (Tabla 1) adaptada para las necesidades fisiológicas de frijol, con pH de 6 ± 0.1 . Se aplicaron 500 mL de solución nutritiva por maceta cada 48 h hasta la etapa de floración y 1000 mL hasta la cosecha. Se aplicó un manejo agronómico tradicional y se realizaron dos aplicaciones de Imidacloprid pulverizado a una dosis de 2 mL · L, para control de mosquita blanca.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar, unifactorial con un solo nivel, en donde se compararon la aplicación de ClO_2 a 30 ppm, nano Zn-Mo a 4 ppm y un control al cual se le aplicó agua destilada. Los tratamientos se aplicaron semanalmente a partir de los 15 días después de la siembra, con un total de 5 aplicaciones. En total se contó con 3 tratamientos y 6 repeticiones en cada uno de ellos. La unidad experimental fue una planta por maceta (Figura 1).

Tabla 1. Composición de la solución nutritiva estándar Hoagland adaptada para cultivo de frijol ejotero.

Macronutrientes		
Compuesto	Fórmula química	Concentración (mM)
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	6
Fosfato de potasio dibásico	K_2HPO_4	1.6
Sulfato de potasio	K_2SO_4	0.3
Cloruro de calcio	CaCl_2	4
Sulfato de magnesio	MgSO_4	1.4
Micronutrientes		
Compuesto	Fórmula química	Concentración (μM)
Quelato de hierro	Fe-EDDHA	5
Sulfato de manganeso	MnSO_4	2
Sulfato de cobre	CuSO_4	0.15
Ácido bórico	H_3BO_3	3.5
Molibdato de sodio	Na_2MoO_4	0.3

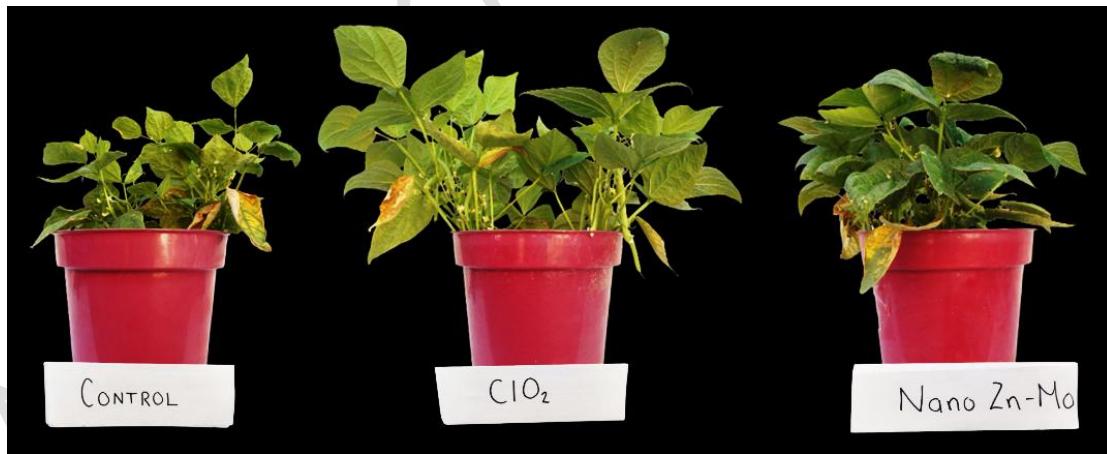


Figure 1. Efecto de la aplicación foliar de dióxido de cloro (ClO_2) y nano Zn-Mo en plantas de frijol ejotero cv. Strike.

Muestreo vegetal

Biomasa total y rendimiento

Una vez llegada la madurez fisiológica, a los 53 días después de la siembra, las plantas se cosecharon para el muestreo vegetal. De cada maceta se eligió una planta al azar, la cual se pesó en fresco mediante una balanza compacta (A&D Co., LTD, EK-120, Tokio, Japan). Posteriormente, se diseccionó la planta en hojas, tallo, vainas y raíz, y se pesó cada uno de los órganos en fresco. El rendimiento se expresó como el peso fresco de las vainas por planta ($\text{g planta}^{-1} \text{ FW}$).

Los órganos obtenidos se enjuagaron tres veces en agua destilada y se secaron sobre papel filtro a temperatura ambiente por 24 h. Una vez transcurrido este periodo, el material vegetal se secó dentro de un horno de laboratorio de aire forzado de 13.9 pies cúbicos (Shel-Lab 1380FX, Oregon, United States) a 70 °C durante 24 h. Después de que las muestras perdieron la humedad, se pesaron con una balanza analítica electrónica (A&D Co., LTD, HR-120, Tokio, Japan). La biomasa total se expresó como la suma del peso seco de los cuatro órganos de la planta ($\text{g planta}^{-1} \text{ FW}$). Finalmente, las muestras se molieron y se almacenaron para la cuantificación de nitrógeno y carbono total.

La planta que no fue sometida a secado se dividió en hojas, tallo, fruto y raíz y fue utilizada *in vivo* para la cuantificación de la actividad nitrato reductasa, clorofila total, aminoácidos solubles y concentración de sacarosa.

Índice de clorofila

Para la cuantificación del índice de clorofila se utilizó un lector de clorofila Minolta SPAD 502 (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japón). Se seleccionaron hojas sanas de color homogéneo y libre de daños. Los valores se reportaron como valores SPAD.

Actividad de la enzima nitrato reductasa “*in vivo*” (E.C. 1.7.1.1)

La actividad de la enzima nitrato reductasa se cuantificó por el método descrito por **Sánchez et al. (2004)**. Se pesaron 0.25-0.5 g de discos foliares y se infiltraron con 10 mL de una solución buffer-P 100 mM (solución 18.21 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 1 L de agua destilada, regulada a pH de 7.5 con una solución de 13.60 g de KH_2PO_4 disueltos en 1 L de agua destilada), para la actividad endógena y con buffer-P 100 mM, pH 7.5 con 50 mM de KNO_3 para la actividad infiltrada con NO_3^- . Las muestras se infiltraron al vacío a 0.8 bar (NAPCO 5851 vacuum oven, Winchester, Virginia, USA) durante 10 min y se incubaron (WIG-50 digital incubator, DAIHAN SCIENTIFIC, Seoul, Korea) en oscuridad a 30 °C. Después de 1 h, las muestras se sometieron a un baño de agua a 100 °C durante 15 min. A continuación, se extrajo una alícuota de 1 mL y se mezcló con 2 mL de sulfanilamida al 1 % (1 g de sulfanilamida disuelta en 100 mL de agua destilada y HCl en proporción 4:1 (v/v)). Después, se agregaron 2 mL de N-(1-Naftil) etilendiamina diclorhidrato al 0.02 % (20 mg de NNEDA disueltos en 100 mL de agua destilada). La mezcla de reacción se midió por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 en un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Fisher Scientific, GENESYS™ 10S, Wisconsin, United States). Los resultados se expresaron como $\mu\text{M } \text{NO}_2^- \text{ reducidos} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW} \cdot \text{h}^{-1}$.

Concentración de aminoácidos solubles

Se homogenizaron 0.5 g de muestra vegetal del limbo foliar con 5 mL de buffer fosfato 50 mM, pH 7 a 4 °C (solución de 6.8 g de K_2HPO_4 disueltos en 1 L de agua destilada, regulada a pH de 7 con una solución de 8.81 g de KH_2PO_4 , disueltos en 1 L de agua destilada). La muestra se filtró con

4 capas de gasa y se centrifugó a 1000 rpm durante 15 min en una centrífuga refrigerada a 4 °C (Allegra™, 64R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, California, United States). El sobrenadante fue utilizado para la determinación de la concentración de aminoácidos solubles a través del método descrito por [Yemm et al. \(1955\)](#). Los resultados se expresaron como (mg · g⁻¹ FW).

Concentración de clorofila total

La concentración de clorofila total se determinó por el método descrito por [Wellburn \(1994\)](#). Se pesaron 10 discos foliares de 7 mm de diámetro y se infiltraron con 10 mL de metanol (CH₃OH). Las muestras se sellaron y se dejaron reposar en oscuridad por 24 h. Pasado ese tiempo, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 653 y 666 nm para clorofila b y clorofila a, respectivamente, utilizando un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Fisher Scientific, GENESYS™ 10S, Wisconsin, United States). La concentración de clorofila total representó la suma de las clorofilas a y b y se expresaron como µg·cm⁻² y se calcularon con las siguientes fórmulas (Ecuación 1, ecuación 2):

$$1. Chl\ a = (15.65 \times abs\ 666) - (7.34 \times abs\ 653)$$

$$\frac{Chl\ a \times V \times P1}{P2 \times (\pi \times r^2) \times n}$$

$$2. Chl\ b = (27.05 \times abs\ 653) - (11.21 \times abs\ 666)$$

$$\frac{Chl\ b \times V \times P1}{P2 \times (\pi \times r^2) \times n}$$

Donde, V: Volumen final; P1: Peso por disco foliar; P2: Peso total de los discos foliares; r: radio de los discos foliares; n: Número de discos foliares.

Concentración de nitrógeno y carbono total

Para la cuantificación de nitrógeno y carbono total se utilizó un analizador orgánico elemental (Thermo Fisher Scientific, FLASH 2000, Massachusetts, United States). Además, se usó como base la metodología adaptada por [Schindler y Knighton \(1999\)](#) para material vegetal. 0.3 mg del material vegetal molido (hoja, tallo, fruto y raíz) se pesaron sobre un microcontenedor de estaño blando en una ultra-microbalanza (Mettler Toledo, XP6 Excellence Plus XP, Ohio, United States), al cual se le agregaron 9 mg de pentóxido de vanadio (V₂O₅) y posteriormente se selló. Las capsulas selladas fueron colocadas dentro del carrusel muestreador automático para su análisis. Los resultados fueron expresados como porcentaje total (%).

Tasa fotosintética, concentración interna de CO₂ y tasa de transferencia de electrones

La tasa fotosintética, la concentración interna de CO₂ y la tasa de transferencia de electrones se midieron en las hojas cuando la planta alcanzó su madurez fisiológica, en un rango de tiempo de 11:00 a.m. a 12:00 p.m. Se utilizó un medidor portátil LI-COR 6400 (Lincoln, Nebraska, USA). Se seleccionaron hojas sanas de color homogéneo y libre de daños. En la celda de referencia se utilizó una concentración de 400 µmol por mol de CO₂, mientras que la celda de muestra se mantuvo a

aproximadamente 380 μmol por mL de CO_2 . El déficit de presión de vapor de aire en la cámara de muestreo fue inferior a 1,5 y la temperatura del bloque que albergaba la hoja fue de 25 °C. La tasa fotosintética se expresó como $\mu\text{M CO}_2 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. La concentración interna de CO_2 se expresó como $\mu\text{M CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$. La tasa de transferencia de electrones se expresó como $\mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Concentración de sacarosa

Para la determinación de la concentración de sacarosa, se utilizó el método descrito por [Irigoyen et al. \(1992\)](#). Se pesaron 0.5 g de material vegetal fresco del limbo foliar y se homogenizaron con 5 mL de etanol al 96 % (v/v) ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$). El resultante se filtró con 4 capas de gaza y se le aplicaron dos enjuagues con 5 mL de etanol al 70 % (v/v). La mezcla resultante se centrifugó a 4 °C a 5500 rpm durante 10 min en una centrífuga refrigerada (Allegra™, 64R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, California, United States). Se trajeron 0.1 mL del sobrenadante y se le añadieron 3 mL de reactivo de antrona (300 mg de antrona ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}$) disueltos en 300 mL de ácido sulfúrico al 70 % (v/v)). Las muestras se sumergieron durante 10 min en un baño de agua a 100 °C. Finalmente, se midió la concentración de sacarosa mediante un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Fisher Scientific, GENESYS™ 10S, Wisconsin, United States) a 650 nm frente a una curva patrón de sacarosa. Los resultados se expresaron como miligramos por gramo de peso fresco ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ FW).

Análisis estadístico

Una vez obtenidos los datos, se sometieron a una prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la distribución normal de los datos. Adicionalmente, se sometieron a una prueba de Bartlett para comprobar la homogeneidad de las varianzas. Una vez comprobados los supuestos, los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía y una prueba de separación de medias mediante la prueba LSD-Fisher. Para los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico SAS 9.0. Letras diferentes mostraron diferencias estadísticamente significativas según la prueba de LSD-Fisher ($p \leq 0.05$). Nivel de significancia: NS: No significativo; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

Resultados

Biomasa y rendimiento

La eficacia de los compuestos foliares aplicados se observó en la acumulación de biomasa, cuyo valor se incrementó significativamente tanto con dióxido de cloro como con nano Zn-Mo en comparación al control (Figura 2A). Además, a pesar de que la mayor acumulación se presentó con la aplicación de ClO_2 , con un incremento de 29 % con respecto al control, no hubo diferencia significativa frente a la aplicación de nano Zn-Mo. Por lo tanto, ambos compuestos son eficaces para incrementar la acumulación de biomasa total ($p \leq 0.01$).

El rendimiento de vainas en plantas de frijol fue estimulado por la aplicación de nano Zn-Mo (Figura 2B), que mostró un incremento significativo del 145 % con respecto al control y del 90 % con respecto a la aplicación de ClO_2 ($p \leq 0.001$).

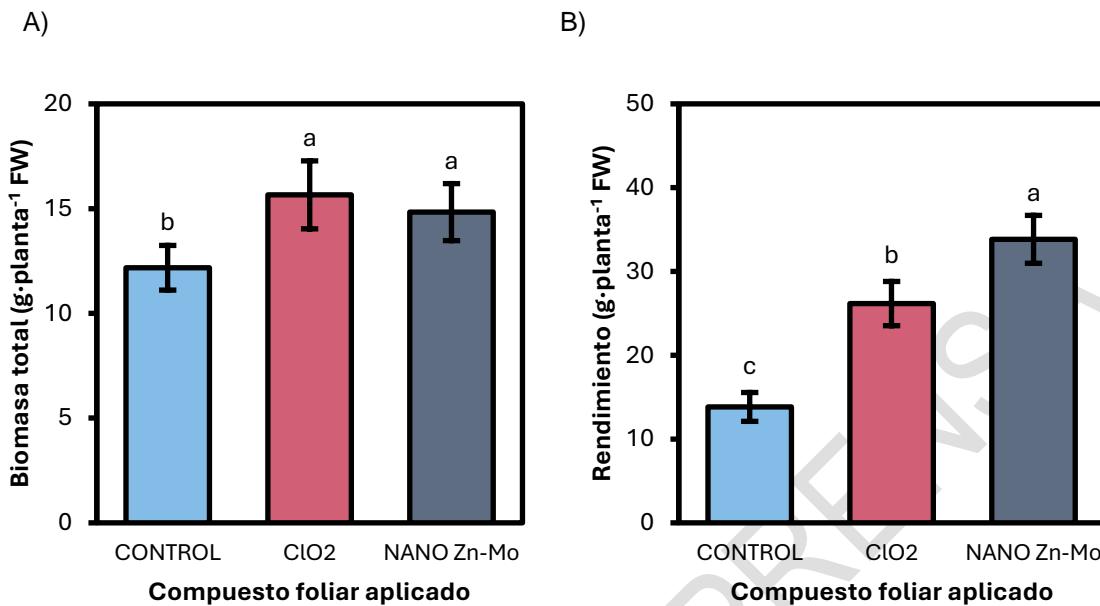


Figura 2. Efecto de la aplicación vía foliar de dióxido de cloro (ClO₂) y nano Zn-Mo en plantas de frijol ejotero cv. Strike sobre la acumulación de biomasa total (A) y rendimiento de vainas (B). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas según la prueba de LSD-Fisher ($p \leq 0.05$).

Índice de clorofila

En el presente experimento, el índice de clorofila medido a través de las unidades SPAD fue afectada en diferentes niveles dependiendo de la fecha de medición (Tabla 2 y Figura 3). A los 18 das, que corresponde a la etapa de formación de hojas primarias, no se encontró diferencia significativa entre tratamientos ($p > 0.05$). A los 25 das, cuando se formaron las tercera hojas trifoliadas, el tratamiento nano Zn-Mo obtuvo las mayores unidades SPAD, con un incremento del 8 % con respecto al control ($p < 0.01$). A los 32 das, en la etapa de prefloración, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$). A los 39 das, en la etapa de floración, el tratamiento ClO₂ sobresalió con respecto al control, con un incremento del 11 % con respecto al control. Sin embargo, no presentó diferencia significativa frente a nano Zn-Mo ($p > 0.01$). Por último, a los 46 das, cuando se formaron las vainas, no se encontraron diferencias significativas, sin embargo, las mayores unidades SPAD se presentaron en el tratamiento nano Zn-Mo, que fue 17 % mayor con respecto al control.

Tabla 2. Efecto de la aplicación vía foliar de dióxido de cloro (ClO_2) y nano Zn-Mo en plantas de frijol ejotero cv. Strike sobre el índice de clorofila. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas según la prueba de LSD-Fisher ($p \leq 0.05$).

		Unidades SPAD				
		18 das	25 das	32 das	39 das	46 das
CONTROL		38.78 \pm 1.70 ^a	41.64 \pm 0.95 ^b	42.75 \pm 4.20 ^a	42.98 \pm 2.10 ^b	40.46 \pm 3.49 ^b
ClO_2		38.84 \pm 0.72 ^a	42.74 \pm 2.14 ^b	44.02 \pm 0.81 ^a	47.51 \pm 4.44 ^a	46.76 \pm 6.31 ^a
NANO Zn-Mo		38.27 \pm 1.10 ^a	45.08 \pm 1.41 ^a	45.60 \pm 2.97 ^a	46.31 \pm 3.84 ^{a,b}	47.40 \pm 4.59 ^a
Nivel de significancia		NS	**	NS	**	NS

das = Días después de la siembra. Nivel de significancia: NS: No significativo; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

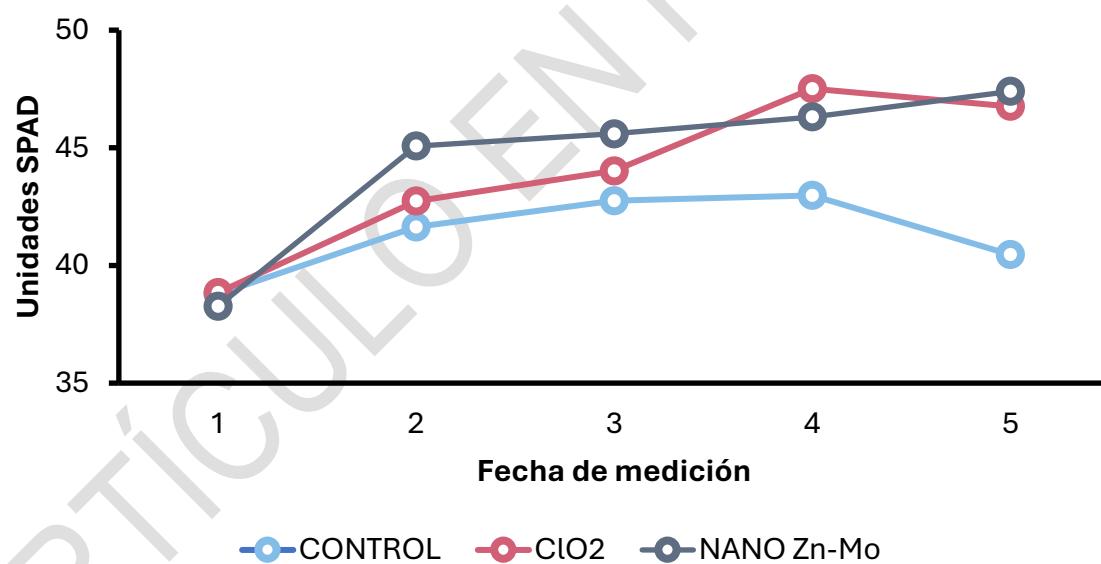


Figura 3. Efecto de la aplicación vía foliar de dióxido de cloro (ClO_2) y nano Zn-Mo en plantas de frijol ejotero cv. Strike sobre la evolución de las unidades durante el ciclo del cultivo.

Actividad de la enzima nitrato reductasa “*in vivo*” (E.C. 1.7.1.1)

En el presente experimento, la actividad de la enzima nitrato reductasa medida “*in vivo*” se vio afectada por la aplicación de ClO_2 y nano Zn-Mo. La mayor actividad se presentó en el tratamiento control, con un incremento significativo del 141 % con respecto a la aplicación de nano Zn-Mo y del 77 % con respecto a la aplicación de ClO_2 ($p > 0.001$).

Concentración de aminoácidos solubles

La concentración de aminoácidos solubles más elevada se presentó en el tratamiento nano Zn-Mo. Este tratamiento se incrementó significativamente en un 71% con respecto al control y en un 49 % con respecto a la aplicación de ClO_2 ($p > 0.001$).

Concentración de clorofila total

Similar a la concentración de aminoácidos solubles, la concentración de clorofila total se elevó significativamente en el tratamiento nano Zn-Mo, con un incremento del 29 % con respecto al control y del 38% con respecto a la aplicación de ClO_2 ($p > 0.001$).

Concentración de nitrógeno total

Los tratamientos de nano Zn-Mo y ClO_2 fueron capaces de elevar la concentración de nitrógeno total foliar en comparación al control. Además, no se encontró diferencia significativa entre ambos tratamientos, pero sin con respecto al control ($p > 0.001$). El tratamiento ClO_2 se incrementó en un 30% con respecto al control, mientras que el tratamiento nano Zn-Mo se incrementó en un 33 % con respecto al control. Finalmente, esto demuestra que ambos compuestos son eficaces para elevar la concentración de nitrógeno en hojas de frijol ejotero.

Tabla 3. Efecto de la aplicación vía foliar de dióxido de cloro (ClO_2) y nano Zn-Mo en plantas de frijol ejotero cv. Strike sobre la actividad de la enzima NR, concentración de aminoácidos solubles, concentración de clorofila total y concentración de nitrógeno total.

	Actividad NR ($\mu\text{M de } \text{NO}_2^-$ formados · g FW · h^{-1})	Aminoácidos solubles (mg · g ⁻¹ FW)	Clorofila total ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^2$ FW)	Nitrógeno total (%)
CONTROL	1.45±0.18 ^a	0.55±0.06 ^b	4.94±0.32 ^b	3.21±0.12 ^b
ClO_2	0.82±0.17 ^b	0.63±0.05 ^b	4.61±0.46 ^b	4.18±0.23 ^a
NANO Zn-Mo	0.60±0.17 ^c	0.94±0.1 ^a	6.37±0.49 ^a	4.28±0.27 ^a
	1.45±0.18 ^a	0.55±0.06 ^b	4.94±0.32 ^b	3.21±0.12 ^b
Nivel de significancia	***	***	***	***

Letras iguales no tiene diferencia estadística significativa según la prueba de LSD-Fisher ($p \leq 0.05$). *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

Tasa fotosintética

Con respecto a la tasa fotosintética, la aplicación de dióxido de cloro obtuvo los mejores resultados. La tasa de fotosíntesis más elevada se encontró en el tratamiento ClO_2 , con un incremento significativo del 141 % con respecto al control y del 70 % con respecto al tratamiento nano Zn-Mo ($p > 0.001$).

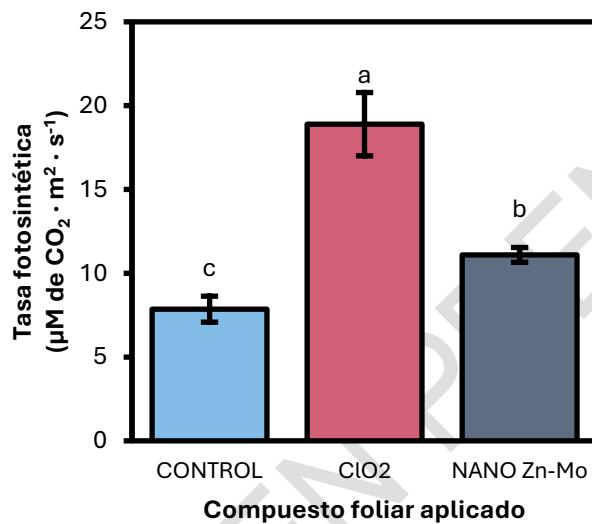


Figura 4. Efecto de la aplicación vía foliar de dióxido de cloro (ClO_2) y nano Zn-Mo en plantas de frijol ejotero cv. Strike sobre la tasa fotosintética.

Concentración interna de CO_2

La concentración interna de CO_2 se vio afectada por la aplicación de ClO_2 y nano Zn-Mo. La mayor concentración se encontró en el tratamiento control. En este caso, el tratamiento nano Zn-Mo se redujo significativamente un 3 % con respecto al control y el tratamiento ClO_2 , se redujo significativamente en un 7 % ($p > 0.001$).

Tasa de transferencia de electrones

En cuanto a la tasa de transferencia de electrones, tanto la aplicación de dióxido de cloro como de nano Zn-Mo fueron capaces de elevar los valores con respecto al control. No obstante, el tratamiento ClO_2 obtuvo la mayor tasa, con un incremento significativo del 76 % con respecto al control y del 34 % con respecto a nano Zn-Mo, siendo el tratamiento más destacado ($p > 0.001$).

Concentración de sacarosa

Con respecto a la concentración de sacarosa, el tratamiento con los valores más altos fue la aplicación de nano Zn-Mo. Dicho tratamiento obtuvo un incremento significativo del 14 % con respecto al control y un incremento no significativo con respecto a ClO_2 del 6 %. En este caso no se

encontraron diferencias significativas entre el tratamiento control y la aplicación de dióxido de cloro ($p > 0.05$).

Concentración de carbono total

Finalmente, la concentración total de carbono foliar fue estimulada en mayor medida con la aplicación de dióxido de cloro. El tratamiento ClO_2 obtuvo un incremento significativo del 3 % con respecto al control, sin embargo, no se encontró diferencia significativa frente al tratamiento nano Zn-Mo ($p > 0.05$).

Tabla 4. Efecto de la aplicación vía foliar de dióxido de cloro (ClO_2) y nano Zn-Mo en plantas de frijol ejotero cv. Strike sobre la concentración interna de CO_2 , tasa de transferencia de electrones, concentración de sacarosa y concentración de carbono total.

	Concentración interna de CO_2	Tasa de transferencia de electrones	Sacarosa	Carbono total
	($\mu\text{M CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$)	($\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)	(%)
CONTROL	395.19 \pm 5.80 ^a	79.39 \pm 17.13 ^c	16.22 \pm 1.71 ^b	40.19 \pm 0.47 ^b
ClO_2	371.06 \pm 6.38 ^c	139.47 \pm 12.39 ^a	17.34 \pm 1.24 ^{ab}	41.45 \pm 0.31 ^a
NANO Zn-Mo	384.03 \pm 4.06 ^b	104.14 \pm 18.94 ^b	18.46 \pm 1.81 ^a	40.99 \pm 0.98 ^{ab}
Nivel de significancia	***	***	*	*

Letras iguales no tiene diferencia estadística significativa según la prueba de LSD-Fisher ($p \leq 0.05$). *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

Discusión

Estudios previos han documentado la efectividad de la aplicación de cloro y nano Zn-Mo en el crecimiento, la asimilación de nitrógeno y fotosíntesis en diversas especies como arroz, trigo, cebada y lechuga. En el presente estudio, la biomasa total de plantas de frijol incrementó tanto con la aplicación de dióxido de cloro como de nano Zn-Mo (Figura 2A). Este comportamiento ya ha sido previamente reportado por varios autores, quienes indican que debido a que el cloro, presente como ion Cl^- es osmóticamente activo y necesario para la turgencia y osmorregulación, está relacionado al crecimiento normal de las plantas (Geilfus, 2018). Por ejemplo, Franco-Navarro *et al.* (2016), reportaron un incremento del 50 % en la biomasa seca de plantas de tabaco tratadas con 5 mM de Cl^- , en comparación con plantas sin tratamiento. Posiblemente el incremento en la biomasa seca de plantas de frijol ejotero observado en el presente experimento se deba al rol del cloro como micronutriente benéfico cuando se aumenta su concentración. Algunas de las respuestas reportadas al suministrar Cl como macronutriente incluyen la expansión foliar, crecimiento general de la planta, osmorregulación y mejor balance hídrico. De forma general, el efecto en el crecimiento de plantas nutridas con cloro se asocia a las alteraciones fisiológicas y morfológicas en el tejido foliar (Franco-Navarro *et al.*, 2016). Por otro lado, el zinc y el molibdeno están presentes en procesos metabólicos

como cofactores, por lo que el desarrollo de plantas está sujeto a la absorción y asimilación de estos micronutrientes (Manuel *et al.*, 2018; Solanki, 2021). Mahdieh *et al.* (2018) informaron que la aplicación foliar de nano partículas de zinc en plantas de frijol logró incrementar en un 16 % la biomasa seca. De la misma forma, Chen *et al.* (2023) indican que la biomasa seca de plantas de plantas de tabaco se incrementó en un 15 % con la aplicación por irrigación de nanopartículas de molibdeno a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Anteriormente se ha reportado que la aplicación de zinc mejora la vigorosidad y estabilidad de las membranas en plantas, por lo cual, el crecimiento incrementa (Mahdieh *et al.*, 2018). Además, otros autores indican que las nanopartículas de zinc favorecen el crecimiento gracias a la mayor producción de auxina (Du *et al.*, 2019).

La eficiencia de los procesos metabólicos como la fotosíntesis, la acumulación de nutrientes, entre otros procesos importantes que ocurren dentro de las plantas condicionan la producción de frutos (Monreal *et al.*, 2016). En cuanto al rendimiento de vainas en el presente experimento, los resultados son similares a los reportados para otras especies. Prasad *et al.* (2012), indican que la adición de nanopartículas de sulfato de Zn a una dosis de 133 mg L logró incrementar un 30 % el rendimiento en plantas de cacahuate en comparación al control. Así mismo, Ybañez *et al.* (2020) reportaron que la aplicación de nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas con ZnCl_2 a una dosis de 32 mg planta, lograron incrementar el rendimiento en tomate en un 134 % en comparación al control y superar el rendimiento de plantas tratadas con nano Zn comercial y Zn granulado. Muñoz-Márquez *et al.* (2022b), quienes aplicaron nano Mo a plantas de frijol a una dosis de 10 ppm, lograron incrementar el rendimiento en un 91 % en comparación al control. Se puede atribuir al aumento en el rendimiento de vainas a la mejora en los procesos fisiológicos relacionados con enzimas, como una mejor asimilación de N, donde participan el zinc y el molibdeno como cofactores, provocando una mayor concentración de asimilados y, por ende, mayor crecimiento y producción (Ghasemi *et al.*, 2013).

La medición del índice de clorofila a través de las unidades SPAD es una herramienta que permite medir cuantitativamente la intensidad del verdor de la hoja, midiendo las transmisiones de luz, donde ocurre absorción de luz por la molécula de clorofila (Cunha *et al.*, 2015). El aumento de los valores SPAD observado en el presente es similar al reportado por Silva *et al.* (2020), quienes no encontraron diferencia en las unidades SPAD en el cultivo de frijol cuando se adicionó Mo a seis dosis (0, 20, 40, 80, 120 y 160 g ha^{-1}). Sin embargo, los parámetros de biomasa y número de vainas si obtuvieron incrementos. Anteriormente, se ha relacionado a micronutrientes como el Zn y el Mo con el mantenimiento en la estructura de la clorofila y con la obtención y conversión de N, que a su vez forma parte de la clorofila (Yeboah *et al.*, 2021). Posiblemente, la aplicación de Nano Zn-Mo permitió una mejor constitución de la clorofila, que finalmente se expresó en un mayor verdor en este tratamiento evaluado.

La enzima nitrato reductasa (NR) participa en la asimilación de nitrógeno y está regulada por el contenido de nitrato y molibdeno, así como su relación entre el contenido de azúcar y de aminoácidos, lo que la convierte en un buen indicador de la asimilación de nitrógeno y carbono en plantas (Ponce-García *et al.*, 2019). Autores como Imran *et al.* (2019), describen aumentos significativos en las actividades NR y NiR de plantas de trigo tratadas con Mo. La actividad de la enzima NR es activada por la presencia del cofactor de Mo (MoCo), que, a su vez, permite la transformación de NO_3^- a NO_2^- y un subsecuente agotamiento del sustrato NO_3^- . Una vez hecho esto, los transportadores de alta afinidad son inducidos a absorber más NO_3^- de la solución (Vigani *et al.*, 2017; Imran *et al.*, 2019). En este sentido, los resultados obtenidos en biomasa total y contenido de nitrógeno orgánico indican que, las plantas de frijol ejotero tratadas con nano Zn-Mo una mayor acumulación de N orgánico total y finalmente un mayor crecimiento expresado en la biomasa total. La mayor actividad de la enzima en el tratamiento control, pudo deberse a la falta de fructificación y una mayor necesidad por crecimiento vegetativo.

Los aminoácidos desempeñan numerosas funciones metabólicas por lo que al medir la concentración de estos se puede obtener el estado fisiológico de la planta (Ramírez-Estrada *et al.*, 2022). La tendencia observada en los tratamientos de este estudio es similar a la reportada por Imran *et al.* (2019), quienes indican que en dos cultivares de trigo, la aplicación de Mo logró aumentar significativamente el contenido de proteínas y aminoácidos solubles, en comparación con plantas deficientes de Mo. Como se mencionó anteriormente, la activación del metabolismo del N impulsada por la presencia del Mo como cofactor de la NR, desencadena finalmente la síntesis de aminoácidos, uno de los productos finales de la ruta de asimilación del N (Liu *et al.*, 2017). Es probable que el aumento en la concentración de aminoácidos solubles se deba al efecto de la aplicación exógena de Mo.

La fotosíntesis es el mecanismo de la planta a través del cual se capta la luz solar y que a su vez se lleva a cabo por la clorofila contenida en los cloroplastos (Muñoz-Márquez *et al.*, 2022a). Los resultados obtenidos concuerdan con Liu *et al.* (2019), quienes lograron incrementar significativamente en un 19.23 % el contenido de clorofila total con la aplicación de zinc y molibdeno en plantas de trigo. Este efecto podría ser atribuido a los roles que tienen tanto el Zn como el Mo en la formación de la clorofila. Se ha demostrado que la deficiencia de Mo puede inhibir la síntesis de clorofila sobre todo en temporadas de invierno, y por su parte, el Zn promueve la formación de clorofila a través de la regulación en concentraciones citoplasmáticas de nutrientes (Bharti *et al.*, 2014).

La cuantificación de la concentración de nitrógeno orgánico es un buen indicador del estado fisiológico y nutrimental de las plantas, por lo que resulta una variable importante para observar la absorción mineral de las plantas tratadas (Leghari *et al.*, 2016). Los datos procedentes del presente estudio son consistentes a lo reportado por Khan *et al.* (2014), quienes observaron aumentos significativos del 111 % con la aplicación de Mo a una dosis de 0.5 kg ha⁻¹ en cultivo de Haba. El efecto positivo en la concentración total de nitrógeno en la planta puede deberse a la relación que guardan estos nutrientes. El Mo es parte integral de una de la enzima clave en el proceso de asimilación de nitrógeno, la NR (Kaiser *et al.*, 2005). Además, en leguminosas, el efecto puede mostrarse aún mejor ya que el molibdeno favorece la integridad de la enzima nitrogenasa en los nódulos fijadores de N atmosférico, por lo que esto podría potenciar la captura y absorción de N (Khan *et al.*, 2014). Finalmente, los datos concuerdan con los obtenidos en biomasa total, rendimiento, pigmentos fotosintéticos, actividad NR y concentración de aminoácidos solubles, apoyando la teoría de que el nano Zn-Mo incrementa todo el proceso de asimilación de N en plantas de frijol.

La medición de la tasa fotosintética es un indicador del correcto funcionamiento del metabolismo de las plantas debido a que es uno de los procesos más importantes de las plantas en el cual convierten la energía solar en energía química para que la planta crezca y se desarrolle adecuadamente (Gutiérrez-Ruelas *et al.*, 2021).

Al igual que Xu *et al.* (2013), los datos obtenidos en el presente trabajo de investigación evidencian los efectos de la aplicación de cloro sobre la tasa fotosintética de plantas. Los autores antes mencionados obtuvieron aumentos del 51 y 48.7 % en plantas *Zoysia japónica* sobre la tasa fotosintética al adicionar cloro a dosis de 10 y 20 mM respectivamente. Dicho aumento se podría deber al papel señalizador del cloro en metabolismo de las plantas. El transporte de electrones dentro del aparato fotosintético en las membranas de los tilacoides es muy sensible a la concentración de iones como el Cl⁻ (Herdean *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado que plantas tratadas con cloro poseen una mayor capacidad para prevenir el daño de la deshidratación celular equilibrando la fuerza osmótica del citoplasma, mejorar el estado hídrico y por lo tanto promover la fotosíntesis sobre aquellas sin aplicación (Ben Amor *et al.*, 2010). Así mismo, los datos obtenidos acerca de la tasa de

transporte de electrones y tasa interna de CO_2 corresponden al rol del cloro en la activación de enzimas involucradas en el fotosistema II. El Cl^- es cofactor esencial para la evolución del oxígeno, a pesar de que aún no se determina en su totalidad cómo se cataliza el oxígeno (Pokhrel *et al.*, 2011).

Watanabe *et al.* (2016), determinaron que la aplicación de cloruro de potasio a dosis de 0.75 g maceta⁻¹ promovieron la acumulación de sacarosa en el cultivo de caña de azúcar, en comparación con otras fuentes de potasio, por lo que se podría atribuir a la fertilización con cloro. Sin embargo, Wu *et al.* (2015), descubrieron que la aplicación de dosis desde 0 hasta 150 mM de cloruro de sodio en remolacha azucarera no tuvo efecto significativo en la acumulación de sacarosa. La respuesta de la producción de azúcares solubles parece depender de la especie e inclinarse al metabolismo del N más que del C. El crecimiento de los brotes vegetativos está sujeto a la translocación de N y C asimilados, que a su vez depende de la correcta asimilación de NO_3^- y CO_2 . La absorción de N por las raíces está sujeta a más factores adversos que la obtención de CO_2 por la fotosíntesis, por lo que la acumulación de productos de asimilación de la fotosíntesis podría ser más dependiente de un correcto ciclo de asimilación del N (Lawlor, 2002).

Desde un punto de vista agronómico, el rendimiento es el aspecto más importante a considerar para producción de cultivos (Prahdan *et al.*, 2015). Sin embargo, cuando se discute el funcionamiento del metabolismo primario para fines de investigación, es necesario tomarlo en cuenta ya que, el rendimiento es la consecuencia de la bioquímica de las plantas. Autores han mencionado que, en resumen, el contenido de nitrógeno disponible está relacionada a la síntesis de aminoácidos y, por lo tanto, de proteínas y otros componentes celulares (Hildebrandt *et al.*, 2015). Para una asimilación acelerada de CO_2 son necesarios cloroplastos bien constituidos y la síntesis normal de la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa-oxidasa (Rubisco), además de poder reductor de NADP^+ . Los primeros dos componentes son dependientes de un suministro adecuado de N. Así mismo, para capturar y transformar la energía fotosintética, se requiere una gran cantidad de clorofila, por lo que igualmente, el N apoya este proceso. En consecuencia, el correcto suministro de N también permite la asimilación de CO_2 a triosas fosfato y finalmente a sacarosa (Zhong *et al.*, 2017; Lawlor, 2002).

El tratamiento evaluado con el mayor rendimiento fue Nano Zn-Mo (Figura 2). De igual manera, la mayor acumulación de N total se observó en el mismo tratamiento, así como mayor concentración de aminoácidos solubles, clorofila total y unidades SPAD (Tabla 3, Figura 3). En cambio, la mayor tasa fotosintética y tasa de transferencia de electrones se observó con la aplicación de ClO_2 (Tabla 4). El tratamiento control obtuvo mayor actividad NR y una concentración interna de CO_2 más alta (Tabla 3, Tabla 4). Probablemente, la asimilación de N fue el factor que favoreció en tratamiento Nano Zn-Mo, expresado en mayor rendimiento, a diferencia del tratamiento con ClO_2 , que solo obtuvo efecto mejorado en la transformación de energía fotosintética (Figura 5). El tratamiento control obtuvo una mayor actividad NR y una mayor concentración interna de CO_2 , posiblemente con el fin de compensar la baja acumulación de N, se incrementó la síntesis de la enzima, y del mismo modo, esa baja acumulación de N limitó la asimilación de CO_2 a azúcares solubles, por lo cual la concentración interna se elevó.

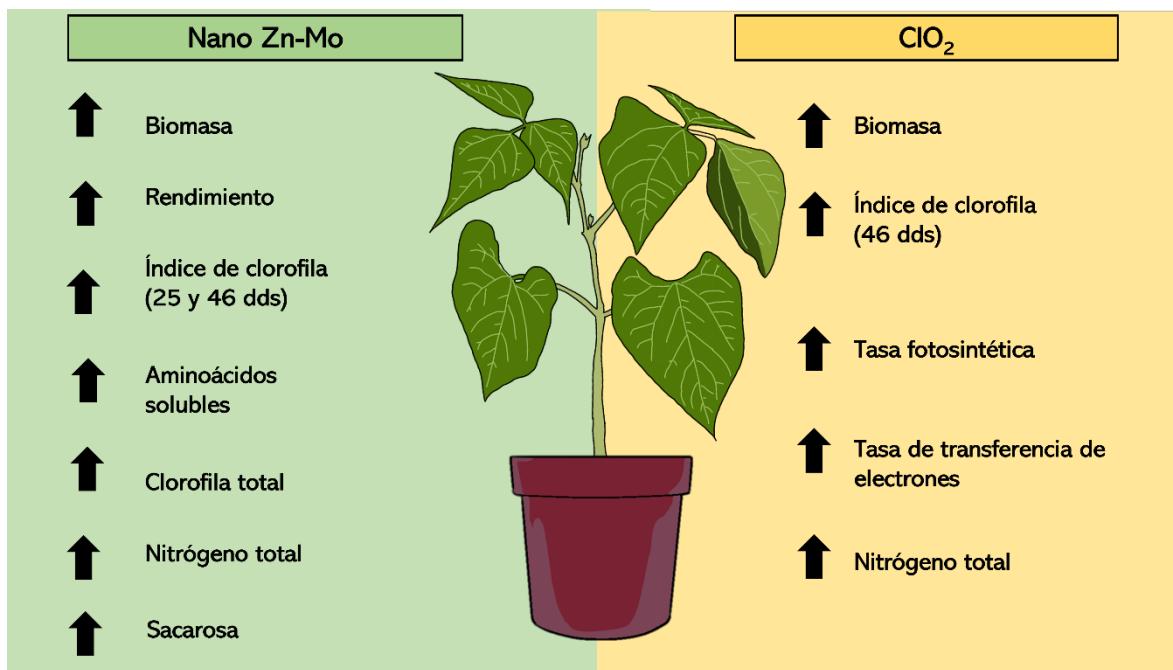


Figura 5. Resumen gráfico del efecto de la aplicación vía foliar de dióxido de cloro (ClO_2) y nano Zn-Mo en plantas de frijol ejotero cv. Strike.

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que la aplicación foliar de nano Zn-Mo a dosis de 4 ppm a partir de la aparición de la primera hoja verdadera (V3, 15 dpias después de la siembra) se considera una opción viable para incrementar biomasa, rendimiento, concentración de aminoácidos solubles, clorofila y nitrógeno totales en plantas de frijol ejotero cv Strike. Además, la aplicación foliar de dióxido de cloro a dosis de 30 ppm logró incrementar la biomasa, tasa fotosintética, tasa de transferencia de electrones, índice de clorofila y nitrógeno total. Finalmente, los resultados sugieren que la asimilación de carbono está integrada a la asimilación de nitrógeno en plantas de frijol, siendo el suministro de nitrógeno como componente celular el factor crucial para impulsar ambos metabolismos.

Contribución de los autores

“Conceptualización del trabajo, Sánchez, E., Ramírez Estrada, C.A., Rábago Gonzalez, Y.; desarrollo de la metodología, Sánchez, E., Ramírez Estrada, C.A., Palacio Márquez, A.; manejo de software Ramírez Estrada, C.A.; Sánchez, E.; análisis de resultados, Palacio Márquez, A., Pérez Álvarez, S., Rivas Lucero, B. A.; Manejo de datos, Ramírez Estrada, C.A., Palacio Márquez, A.; escritura y preparación del manuscrito, Ramírez Estrada, C.A., Rábago Gonzalez, Y., Sánchez, E., Palacio Márquez, A., Pérez Álvarez, S., Rivas Lucero, B. A.; redacción, revisión y edición, Ramírez Estrada, C.A., Palacio Márquez, A.; escritura y preparación del manuscrito, Ramírez Estrada, C.A., Rábago Gonzalez, Y., Sánchez, E., Palacio Márquez, A., Pérez Álvarez, S., Rivas Lucero, B. A.; administrador de proyectos, Sánchez, E.; adquisición de fondos, Sánchez, E.

“Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.”

Agradecimientos

En Este trabajo de investigación se realizó gracias al apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT, México) a través del apoyo financiero otorgado por el programa nacional de becas para estudios de posgrado bajo el CVU No. 1011744 y el proyecto de la Convocatoria para la atención de la Problemática Nacional: Proyecto #1529 «Biofortificación de cultivos agrícolas básicos que representan la clave para combatir la desnutrición y garantizar la seguridad alimentaria en México».

Conflictos de interés

“Los autores declaran no tener conflicto de interés”.

Referencias

- Al-Mamun, M. R., Hasan, M. R., Ahommed, M. S., Bacchu M. S., Ali, M. R., & Khan, M. Z. H. (2021). Nanofertilizers towards sustainable agriculture and environment. *Environmental Technology & Innovation*, 23, 101658.<https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101658>
- Alexander, P., Rounsevell, M. D., Dislich, C., Dodson, J. R., Engström, K., & Moran, D. (2015). Drivers for global agricultural land use change: The nexus of diet, population, yield and bioenergy. *Global Environmental Change*, 35, 138-147.<https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2015.08.011>
- Ben Amor, N., Megdiche, W., Jiménez, A., Sevilla, F., & Abdelly, C. (2010). The effect of calcium on the antioxidant systems in the halophyte *Cakile maritima* under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32, 453-461.<https://doi.org/10.1007/s11738-009-0420-2>
- Bharti, K., Pandey, N., Shankhdhar, D., Srivastava, P. C., & Shankhdhar, S. C. (2014). Effect of exogenous zinc supply on photosynthetic rate, chlorophyll content and some growth parameters in different wheat genotypes. *Cereal Research Communications*, 42, 589-600.<https://doi.org/10.1556/CRC.2014.0015>
- Bloom, A. J. (2015). Photorespiration and nitrate assimilation: a major intersection between plant carbon and nitrogen. *Photosynthesis research*, 123(2), 117-128.<https://doi.org/10.1007/s11120-014-0056-y>
- Chen, J., Yin, Y., Zhu, Y., Song, K., & Ding, W. (2023). Favorable physiological and morphological effects of molybdenum nanoparticles on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): root irrigation is superior to foliar spraying. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1220109 <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1220109>
- Cunha, A. R. D., Katz, I., Sousa, A. D. P., & Martínez Uribe, R. A. (2015). Índice SPAD en el crecimiento y desarrollo de plantas de *lisianthus* en función de diferentes dosis de nitrógeno en ambiente protegido. *Idesia (Arica)*, 33(2), 97-105.<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292015000200012>
- Du, W., Yang, J., Peng, Q., Liang, X., & Mao, H. (2019). Comparison study of zinc nanoparticles and zinc sulphate on wheat growth: From toxicity and zinc biofortification. *Chemosphere*, 227, 109-116.<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.168>
- Franco-Navarro, J. D., Brumós, J., Rosales, M. A., Cubero-Font, P., Talón, M., & Colmenero-Flores, J. M. (2016). Chloride regulates leaf cell size and water relations in tobacco plants. *Journal of Experimental Botany*, 67(3), 873-891.<https://doi.org/10.1093/jxb/erv502>
- Ghasemi, S., Khoshgoftaramesh, A. H., Afyuni, M., & Hadadzadeh, H. (2013). The effectiveness of foliar applications of synthesized zinc-amino acid chelates in comparison with zinc sulfate to increase yield and grain nutritional quality of wheat. *European Journal of Agronomy*, 45, 68-74.<https://doi.org/10.1016/j.eja.2012.10.012>
- Geilfus, C. M. (2018). Review on the significance of chlorine for crop yield and quality. *Plant Science*, 270, 114-122.<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.014>
- Govindan, K. (2018). Sustainable consumption and production in the food supply chain: A conceptual framework. *International Journal of Production Economics*, 195, 419-431.<https://doi.org/10.1016/j.ijpe.2017.03.003>
- Gutiérrez-Ruelas, N. J., Palacio-Márquez, A., Sanchez, E., Muñoz-Márquez, E., Chávez-Mendoza, C., Ojeda-Barrios, D. L., & Flores-Cordova, M. A. (2021). Impact of the foliar application of nanoparticles, sulfate and iron chelate on the growth, yield and nitrogen assimilation in green beans. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(3), 12437-12437.<https://doi.org/10.15835/nbha49312437>
- Herdean, A., Teardo, E., Nilsson, A. K., Pfeil, B. E., Johansson, O. N., Ünnep, R., Nagy, G., Zsiros, O., Dana, S., Solymosi, K., Garab, G., Szabó, I., Cornelia Spetea & Lundin, B. (2016). A voltage-dependent chloride channel fine-tunes photosynthesis in plants. *Nature communications*, 7(1), 11654.<https://doi.org/10.1038/ncomms11654>

- Hildebrandt, T. M., Nesi, A. N., Araújo, W. L., & Braun, H. P. (2015). Amino acid catabolism in plants. *Molecular plant*, 8(11), 1563-1579. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>
- Imran, M., Sun, X., Hussain, S., Ali, U., Rana, M. S., Rasul, F., Saleem, M. H., Mohamed, G. M., Parashuram, B., Javaria, A., Ali, M. E. & Hu, C. X. (2019). Molybdenum-induced effects on nitrogen metabolism enzymes and elemental profile of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under different nitrogen sources. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 3009. <https://doi.org/10.3390/ijms20123009>
- Irigoyen, J. J., Einerich, D. W., & Sánchez-Díaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia plantarum*, 84(1), 55-60. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb08764.x>
- Kaiser, B. N., Gridley, K. L., Ngaire Brady, J., Phillips, T., & Tyerman, S. D. (2005). The role of molybdenum in agricultural plant production. *Annals of Botany*, 96(5), 745-754. <https://doi.org/10.1093/aob/mci226>
- Khan, N., Tariq, M., Ullah, K., Muhammad, D., Khan, I., Rahatullah, K., & Ahmed, S. (2014). The effect of molybdenum and iron on nodulation, nitrogen fixation and yield of chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.). *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 7(1), 63-79. <https://www.iosrjournals.org/iosr-javs/papers/vol7-issue1/Version-3/L07136379.pdf>
- Lawlor, D. W. (2002). Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of experimental Botany*, 53(370), 773-787. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.773>
- Leghari, S. J., Wahocho, N. A., Laghari, G. M., HafeezLaghari, A., MustafaBhabhan, G., HussainTalpur, K., & Lashari, A. A. (2016). Role of nitrogen for plant growth and development: A review. *Advances in Environmental Biology*, 10(9), 209-219. <https://go.gale.com/ps/anonymous?id=GALE%7CA472372583&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs%0D>
- Liu, L., Xiao, W., Li, L., Li, D. M., Gao, D. S., Zhu, C. Y., & Fu, X. L. (2017). Effect of exogenously applied molybdenum on its absorption and nitrate metabolism in strawberry seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115, 200-211. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.015>
- Liu, C., Hu, C., Tan, Q., Sun, X., Wu, S., & Zhao, X. (2019). Co-application of molybdenum and zinc increases grain yield and photosynthetic efficiency of wheat leaves. *Plant, Soil and Environment*, 65(10), 508-515. <https://doi.org/10.17221/508/2019-PSE>
- Mahdиеh, M., Sangi, M. R., Bamdad, F., & Ghanem, A. (2018). Effect of seed and foliar application of nano-zinc oxide, zinc chelate, and zinc sulphate rates on yield and growth of pinto bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 41(18), 2401-2412. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1510517>
- Tejada-Jimenez, M., Chamizo-Ampudio, A., Llamas, A., Galván, A., & Fernandez, E. (2018). Roles of molybdenum in plants and improvement of its acquisition and use efficiency. In *Plant micronutrient use efficiency* (pp. 137-159). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812104-7.00009-5>
- Monreal, C. M., DeRosa, M., Mallubhotla, S. C., Bindraban, P. S. & Dimkpa, C. 2016. Nanotechnologies for increasing the crop use efficiency of fertilizer-micronutrients. *Biology and fertility of soils*, 52, 423-437. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-1073-5>
- Muñoz-Márquez, E., Soto-Parra, J. M., Noperi-Mosqueda, L. C., & Sánchez, E. (2022a). Application of molybdenum nanofertilizer on the nitrogen use efficiency, growth and yield in green beans. *Agronomy*, 12(12), 3163. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123163>
- Muñoz-Márquez, E., Soto-Parra, J. M., Pérez-Leal, R., Yáñez-Muñoz, R. M., Noperi-Mosqueda, L. C., & Sánchez-Chávez, E. (2022b). Aplicación de nanomolibdó en frijol y su impacto sobre la eficiencia del nitrógeno. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(SPE28), 319-329. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i28.3286>
- Qaim, M. (2020). Role of new plant breeding technologies for food security and sustainable agricultural development. *Applied Economic Perspectives and Policy*, 42(2), 129-150. <https://doi.org/10.1002/aapp.13044>
- Pardey, P. G., Beddow, J. M., Hurley, T. M., Beatty, T. K., & Eidman, V. R. (2014). A bounds analysis of world food futures: Global agriculture through to 2050. *Australian Journal of Agricultural and Resource Economics*, 58(4), 571-589. <https://doi.org/10.1111/1467-8489.12072>
- Pokhrel, R., McConnell, I. L., & Brudvig, G. W. (2011). Chloride regulation of enzyme turnover: application to the role of chloride in photosystem II. *Biochemistry*, 50(14), 2725-2734. <https://doi.org/10.1021/bi2000388>
- Ponce-García, C. O., Soto-Parra, J. M., Sánchez, E., Muñoz-Márquez, E., Piña-Ramírez, F. J., Flores-Córdova, M. A., ... & Yáñez Muñoz, R. M. (2019). Efficiency of nanoparticle, sulfate, and zinc-chelate use on biomass, yield, and nitrogen assimilation in green beans. *Agronomy*, 9(3), 128. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030128>
- Pradhan, P., Fischer, G., Van Velthuizen, H., Reusser, D. E., & Kropf, J. P. (2015). Closing yield gaps: how sustainable can we be?. *PLoS one*, 10(6), e0129487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129487>
- Prasad, T. N. V. K. V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K. R., Sreeprasad, T.S., Sajanlan, P.S. & Pradeep, T. (2012). Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of plant nutrition*, 35(6), 905-927. <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.663443>
- Ramírez-Estrada, C. A., Sánchez, E., Flores-Cordova, M. A., Chávez-Mendoza, C., Muñoz-Márquez, E., Palacio-Márquez, A., & Hernández-Figueroa, K. I. (2022). Efficiency and assimilation of nitrogen in bean plants through foliar application of zinc and molybdenum nano fertilizer. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 50(2), 12719-12719. <https://doi.org/10.15835/NBHA50212719>
- Sánchez, E., Rivero, R. M., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2004). Changes in biomass, enzymatic activity and protein concentration in roots and leaves of green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) under high NH₄NO₃ application rates. *Scientia horticulturae*, 99(3-4), 237-248. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(03\)00114-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(03)00114-6)

- Schindler, F. V., & Knighton, R. E. (1999). Sample preparation for total nitrogen and 15N-ratio analysis by the automated Dumas combustion method. *Communications in soil science and plant analysis*, 30(9-10), 1315-1324. <https://doi.org/10.1080/00103629909370287>
- Silva, M. S. D., Oliveira, G. R. F. D., Merloti, L. F., Bossolani, J. W., Camargos, L. S. D., de Sá, M. E., & Reis, A. R. D. (2020). New insights on molybdenum fertilization in common bean under no-tillage system: rates and application time to obtain high vigor seeds. *Journal of Plant Nutrition*, 44(10), 1420-1431. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1849290>
- Singh, M. D. (2017). Nano-fertilizers is a new way to increase nutrients use efficiency in crop production. *International Journal of Agriculture Sciences*, 9(7), 0975-3710. https://www.researchgate.net/profile/Hari-Meena/publication/344318260_Nano-fertilizers_is_a_New_Way_to_Increase_Nutrients_Use_Efficiency_in_Crop_Production/links/5f670700299bf1b53ee440d9/Nano-Fertilizers-is-a-New-Way-to-Increase-Nutrients-Use-Efficiency-in-Crop-Production.pdf
- Solanki, M. (2021). The Zn as a vital micronutrient in plants. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 11(3), e4026-e4026. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.4026>
- Subramanian, K. S., Manikandan, A., Thirunavukkarasu, M., & Rahale, C. S. (2015). Nano-fertilizers for balanced crop nutrition. *Nanotechnologies in food and agriculture*, 69-80. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14024-7_3
- Sun, X., Baldwin, E., & Bai, J. (2019). Applications of gaseous chlorine dioxide on postharvest handling and storage of fruits and vegetables—a review. *Food Control*, 95, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.044>
- Vigani, G., Di Silvestre, D., Agresta, A. M., Donnini, S., Mauri, P., Gehl, C., Bittner, F. & Murgia, I. (2017). Molybdenum and iron mutually impact their homeostasis in cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *New Phytologist*, 213(3), 1222-1241. <https://doi.org/10.1111/nph.14214>
- Watanabe, K., Fukuzawa, Y., Kawasaki, S. I., Ueno, M., & Kawamitsu, Y. (2016). Effects of potassium chloride and potassium sulfate on sucrose concentration in sugarcane juice under pot conditions. *Sugar Tech*, 18, 258-265. <https://doi.org/10.1007/s12355-015-0392-z>
- Xu, C., Li, X., & Zhang, L. (2013). The effect of calcium chloride on growth, photosynthesis, and antioxidant responses of *Zoysia japonica* under drought conditions. *PloS One*, 8(7), e68214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068214>
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144(3), 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Wu, G. Q., Feng, R. J., Liang, N., Yuan, H. J., & Sun, W. B. (2015). Sodium chloride stimulates growth and alleviates sorbitol-induced osmotic stress in sugar beet seedlings. *Plant growth regulation*, 75, 307-316. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-9954-4>
- Ybañez, Q. E., Sanchez, P. B., Badayos, R. B., & Agravante, J. U. (2020). Synthesis and characterization of nano zinc oxide foliar fertilizer and its influence on yield and postharvest quality of tomato. *e Philippine Agricultural Scientist*, 103(1), 55-65. https://www.researchgate.net/profile/Quincy-Ybanez/publication/346658621_Synthesis_and_Characterization_of_Nano_Zinc_Oxide_Foliar_Fertilizer_and_its_Influence_on_Yield_and_Postharvest_Quality_of_Tomato/links/5fd6f3c3299bf140880a6524/Synthesis-and-Characterization-of-Nano-Zinc-Oxide-Foliar-Fertilizer-and-its-Influence-on-Yield-and-Postharvest-Quality-of-Tomato.pdf
- Yeboah, S., Asibuo, J., Oteng-Darko, P., Asamoah Adjei, E., Lamptey, M., Owusu Danquah, E., Lamptey, M., Owusu-Danquah, E., Waswa, B. & Butare, L. (2021). Impact of foliar application of zinc and magnesium amino chelate on bean physiology and productivity in Ghana. *International Journal of Agronomy*, 2021, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2021/9766709>
- Yemm, E.W., Cocking, E.C., & Ricketts, R.E. (1955). The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, 80(948), 209-214. <https://doi.org/10.1039/AN9558000209>
- Zhong, C., Cao, X., Hu, J., Zhu, L., Zhang, J., Huang, J., & Jin, Q. (2017). Nitrogen metabolism in adaptation of photosynthesis to water stress in rice grown under different nitrogen levels. *Frontiers in plant science*, 8, 1079. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01079>