

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VERIFICACIÓN DE LA POTENCIALIZACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ
CHALQUEÑO CON EL USO DEL AISLADO FÚNGICO CMP4, OBTENIDO EN UN
MEDIO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA “BIOARGOVIT®”

Por

Q.F.B. NORMA ALICIA CONTRERAS GONZÁLEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2025

“Verificación de la potencialización de la germinación de maíz Chalqueño con el uso del aislado fúngico CMP4, obtenido en un medio con nanopartículas de plata “BioArgovit®”.

COMITÉ DE TESIS



Dra. María Julissa Ek Ramos

Director



Dr. Alonso Alberto Orozco Flores

Secretario



Dr. José Alberto Valadez Lira

Vocal

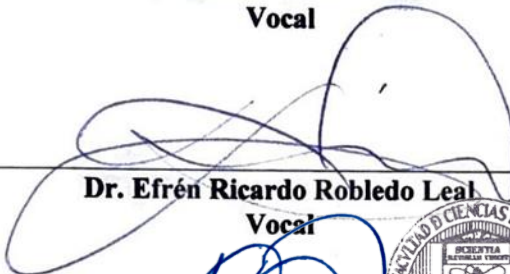


Dr. Hamlet Áviles Arnaut

Vocal

Dr. Efrén Ricardo Robledo Leal

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Nolasco

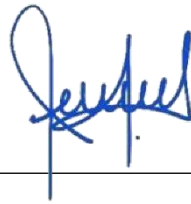
Subdirector de posgrado



**SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO**

“Verificación de la potencialización de la germinación de maíz Chalqueño con el uso del
aislado fúngico CMP4, obtenido en un medio con nanopartículas de plata
“BioArgovit®”.

DIRECCIÓN DE TESIS



Dra. María Julissa Ek Ramos

Director de Tesis



Dra. Nina Bogdanchikova

Director Externo

Aviso derechos de autor

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de video y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando el autor o autores.

Financiamiento:

Este proyecto de investigación fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT :602-CN-2022 y 125-CS-2022) y por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) a través de la beca otorgada a lo largo del posgrado (CVU: 1113981).

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis: La **doctora Julissa**, por su apoyo, orientación y paciencia, los cuales fueron fundamentales durante el desarrollo de esta investigación. Además, por transmitir su sabiduría y por la confianza en mis capacidades para sobrellevar los desafíos que se presentaron y crecer tanto académica como personalmente.

A mi directora externa: La **doctora Nina**, por su tiempo y esfuerzo en enseñarme a mejorar como profesional, guiarme y compartir sus conocimientos en bio-nanotecnología.

Al equipo de trabajo del LIV-UFB: En especial a **Nora, Queta y Doña Rosy**, quienes estuvieron a mi lado en los momentos de mayor estrés y preocupación. Gracias por escucharme, brindarme ánimo y consejo, permitiéndome seguir adelante con mi proyecto y continuar trabajando en el laboratorio. Su apoyo fue invaluable y siempre lo recordaré con gratitud.

A todos los docentes que me ayudaron: En especial al **doctor Alonso**, quien fue un pilar de apoyo durante la elaboración de mi tesis, respondiendo a mis dudas y ofreciendo sugerencias invaluable. **A la doctora Luisa**, le agradezco por enseñarme no solo aspectos académicos, sino también lecciones de vida que me ayudaron a crecer como persona.

Al equipo de trabajo del LPME: Por haberme adoptado en el lab de para. En especial, **al doctor Lucio** por aceptarme y apoyarme durante el último año de mi maestría. Su apoyo emocional y comprensión fueron fundamentales para mí.

A mis amigas: En especial a **Karen y a Viviana**, quienes se convirtieron en mis mejores amigas desde el inicio de la maestría. Juntas superamos muchos obstáculos, nos convertimos en pilares emocionales y formamos un lazo de apoyo muy fuerte. Son muy importantes para mí y espero que nuestra amistad perdure por siempre.

A Ana Karen: Es alguien muy especial para mí, con quien he compartido momentos muy agradables y divertidos. Se ha convertido en una de mis mejores amigas y la admiro profundamente por su personalidad y su capacidad para alegrar cualquier situación.

Al Pochaco: El más ocurrente (Auuuu después de las 2 pm), por su valiosa ayuda en la redacción y análisis de datos de mi tesis. Su sentido del humor y apoyo constante hicieron este proceso mucho más llevadero.

A Jorge, Ana Cris y Cynthia: Por todas las ocurrencias en el comedor. Son los más esquizo y los quiero mucho. Gracias por hacer que los momentos de descanso fueran tan especiales y llenos de risas.

A Arantza y Valeria: Quienes también fueron un apoyo muy importante. Aprendí muchas cosas con ellas y su amistad es algo que jamás voy a olvidar. Gracias por estar siempre ahí y por las valiosas lecciones que me enseñaron.

A mi mejor amigo, Andrés: Quien estuvo a mi lado durante estos dos años, siendo parte de esta travesía a distancia. Aprendimos a vivir en esta ciudad solos, pero siempre apoyándonos mutuamente en diferentes ámbitos. Su amistad ha sido un faro de apoyo constante.

A mis compañeros de maestría: Rodrigo, Daniel, Ángel por acompañarnos en el camino y en especial a **Lizbeth**, quien también ha sido una gran amiga y mentora en muchos aspectos. Es alguien a quien admiro muchísimo y le guardo mucho amor y cariño.

A Angello: Aprecio mucho la paciencia que tuvo al explicarme mil veces cómo hacer cada cosa en el laboratorio. Su amistad durante mi estancia en el laboratorio fue algo que me sirvió de apoyo muchas veces.

A la UANL: Por permitirme los medios necesarios para completar esta investigación.

A CONAHCYT: Por el apoyo económico sin el cual no hubiera podido cumplir adecuadamente mis funciones como tesista en esta institución.

DEDICATORIAS

Esta tesis de maestría está dedicada a mis padres, **Eduardo Contreras y Dolores González**, por su apoyo incondicional desde el momento en que les compartí mi sueño de mudarme a otra ciudad para continuar mis estudios de posgrado. Gracias por estar siempre ahí, escuchándome, ofreciéndome el apoyo emocional que tanto necesité, facilitando mi estancia y velando por mí en cada paso del camino. Su amor y cuidado fueron fundamentales para alcanzar este logro. Además, les agradezco infinitamente por cuidar de mis gatos en mi ausencia; sé que no fue fácil afrontar este proceso de cambios.

A mi gata **Yuki**, la más paciente, siempre la más inteligente e independiente. Donde sea que esté, la llevaré siempre en mi corazón por esos 11 años juntas, por los viernes de enojo, los sábados de reconciliación y los domingos de amor y duelo. Por el tiempo que nunca podré recuperar.

A **Kyubito**, quien me acompañó durante todo el primer semestre, soportando el calor, los mareos en carretera, los nervios y las incomodidades de nuestra mudanza. Sin su compañía, esos primeros meses habrían sido mucho más difíciles. En los momentos de soledad e incertidumbre en una nueva ciudad, su presencia fue mi mayor consuelo.

Y a **Mauricio**, por haber sido parte de mi vida en este camino, en los momentos buenos y en los difíciles. Por los recuerdos que quedaron enredados entre las páginas de este proceso, y por lo que significamos, incluso cuando el tiempo y la distancia nos cambiaron. Siempre llevaré con cariño lo que compartimos y lo que aprendí a tu lado.

Esta dedicatoria es especialmente para ellos, por el tiempo que nunca podré recuperar y por su constante apoyo que me permitió superarme, siempre les estaré agradecida por ser mi ancla y mi inspiración.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS.....	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES.....	2
2.1 <i>Zea mays</i>	2
2.1.1 Maíz Chalqueño	5
2.2 Endófitos fúngicos	7
2.2.1 Tipos de mecanismos de acción de los endófitos benéficos en plantas ...	13
2.3 Nanopartículas de plata:	13
2.3.1 Uso de nanopartículas de plata en plantas:	14
2.3.2 Tipos de síntesis de AgNPs	15
2.3.3 Nanopartículas de plata en el manejo de estrés biótico y abiótico en plantas:	17
2.3.4 Toxicidad de las nanopartículas de plata.....	18
2.3.5 Nanopartículas de plata “BioArgovit”.	19
3 JUSTIFICACIÓN	22
4 HIPÓTESIS.....	23
5 OBJETIVO.....	24
5.1 Objetivo General:	24

5.2	Objetivos específicos:	24
6	MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
6.1	Reactivación de la cepa.....	25
6.2	Identificación de características morfológicas macroscópicas	25
6.3	Identificación de características morfológicas microscópicas	25
6.4	Identificación del aislado por técnicas moleculares.....	25
6.4.1	Extracción de ADN	26
6.2.1	Evaluación de calidad de la muestra	26
6.2.2	Amplificación del segmento ITS1-ITS4	27
6.2.3	Purificación del producto de PCR.....	28
6.2.4	Identificación molecular mediante secuenciación de Sanger.....	28
6.3	Tratamiento del aislado fúngico CMP4 con nanopartículas de plata ("BioArgovit®")	28
6.3.1	Preparación de medios	28
6.3.2	Diluciones de AgNPs	29
6.3.3	Inoculación del medio con nanopartículas.....	29
6.3.4	Filtrado de la biomasa tratada con nanopartículas	29
6.3.5	Preparación de metilcelulosa.....	29
6.4	Tratamiento de las semillas de maíz con el aislado fúngico tratado con AgNPs. 30	
6.4.1	Preparación de las semillas	30
6.4.2	Preparación de la tierra.....	30
6.4.3	Siembra de semillas.....	30
6.5	Determinación del porcentaje de germinación de semillas tratadas con biomasa con AgNPs.....	30

6.5.1	Determinación del vigor del lote de semillas utilizadas en el experimento.	31
6.5.2	Ensayos de fito patogenicidad del aislado fúngico CMP4 en plantas de maíz (in planta).	31
6.6	Análisis estadístico	31
7	RESULTADOS	32
7.1	Identificación de características morfológicas macroscópicas y microscópicas	32
7.2	Identificación del aislado CMP4 por técnicas moleculares.	38
7.2.1	Amplificación de la región ITS	38
7.2.2	Secuenciación de regiones de ITS	39
7.3	Tratamiento del aislado fúngico CMP4 con nanopartículas de plata (“BioArgovit®”)	41
7.3.1	Peso fresco de los tratamientos	41
7.3.2	Viabilidad por resiembra y conteo de esporas por cada tratamiento	43
7.4	Tratamiento de las semillas de maíz con el aislado fúngico tratado con AgNPs.	46
7.4.1	Determinación del vigor del lote de semillas utilizadas en el experimento.	46
7.4.2	Ensayos de fito patogenicidad del aislado fúngico CMP4 en plantas de maíz (in planta).	48
7.4.3	Determinación del porcentaje de germinación de semillas tratadas con biomasa con AgNPs	48
7.5	Análisis Estadístico	51
7.5.1	Tratamiento del aislado fúngico CMP4 con nanopartículas de plata (“BioArgovit®”)	51

7.5.2	Tratamiento de las semillas de maíz con el aislado fúngico tratado con AgNPs.	54
8	DISCUSIÓN	60
8.1	Identificación del aislado fúngico CMP4 mediante técnicas moleculares y por morfología micro y macroscópica.....	60
8.2	Tratamiento del aislado fúngico CMP4 con nanopartículas de plata (“BioArgovit®”)	62
8.3	Tratamiento de las semillas de maíz con el aislado fúngico tratado con AgNPs.	65
9	CONCLUSIONES	67
10	PERSPECTIVAS.....	67
11	BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Zea mays</i> (CFIA, 2021).	2
Tabla 2. Diferentes grupos de razas de maíz en México.	4
Tabla 3. Actividad biológica de endófitos fúngicos y bacterianos en diversos tipos de cultivos y su actividad biológica en diferentes regiones del mundo.	9
Tabla 4. Volúmenes de reacciones.....	27
Tabla 5. Protocolo de PCR utilizado	27
Tabla 6. Descripción de la diferente morfología macroscópica obtenida del aislado fúngico CMP4 a las mismas condiciones ambientales.....	35
Tabla 7. Resultados de la comparación de la secuencia obtenida del aislado en GenBank.	40
Tabla 8. Clasificación taxonómica de <i>Fusarium verticillioides</i>	40
Tabla 10. Resumen del procesamiento de los casos del peso fresco de los tubos con biomasa.	52
Tabla 11. Prueba de normalidad para los pesos de los diferentes tratamientos a los que se sometió el aislado fúngico.....	52
Tabla 12. Estadístico descriptivo de los tratamientos a los que fue sometida la biomasa	53
Tabla 13. ANOVA de un factor del peso fresco del aislado fúngico CMP4 en sus diferentes tratamientos.	53
Tabla 14. Prueba de Tukey del peso fresco del aislado fúngico CMP4 en sus diferentes tratamientos.	53
Tabla 15. Procesamiento de los datos de germinación de semillas tratadas con nanopartículas de plata en la biomasa del aislado fúngico.	54
Tabla 16. Estadística descriptiva de los datos de porcentaje de germinación de las semillas en sus diferentes tratamientos.	55
Tabla 17. Prueba de normalidad para los porcentajes de germinación de las semillas tratadas con nanopartículas de plata en la biomasa.....	55
Tabla 18. Rangos de los tratamientos en el experimento de germinación de semillas de maíz tratados con nanopartículas en la biomasa.	56
Tabla 19. Estadísticos de contraste para la prueba de KW en los tratamientos de nanopartículas en biomasa para la germinación de las semillas.	57

Tabla 20. Resumen de prueba de hipótesis para la germinación de semillas tratadas con nanopartículas en la biomasa.	57
Tabla 21. Comparación de medias por corrección de Bonferroni para el porcentaje de germinación de semillas de maíz tratado con AgNPs en la biomasa.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Maíz de raza Chalqueño. Fotografía de Juan M. Martínez Vargas (CONABIO, 2020a).....	6
Figura 2. Distribución geográfica del maíz de raza Chalqueño en México. En color azul se rellenaron los estados en los que se cultiva mayoritariamente esta raza (CONABIO, 2020a).....	7
Figura 3. Resumen conciso del papel de los endófitos en las plantas frente a condiciones de estrés biótico y abiótico, según Yan et al. (2019).	13
Figura 4. AgNPs; Factores que influyen en su actividad biológica, aplicaciones y efectos en la agricultura (Ali et al. 2021).	19
Figura 5. Cultivo primario de la reactivación del aislado fúngico CMP4.	32
Figura 6. Morfología macroscópica del aislado fúngico CMP4 a una semana de incubación. (A) Anverso de la caja de agar PDA con siembra por picadura del aislado de CMP4. (B) Reverso de la caja del mismo cultivo donde se observa el crecimiento radial filiforme traslúcido. (C) Observación de un cuadro de agar del mismo cultivo al microscopio en 10x con azul de lactofenol.	33
Figura 7. (A) Cultivo del aislado de CMP4 en PDA de tres semanas, con crecimiento radial y formación de micelio en la superficie. Observación macroscópica. (B) Observación del micelio del mismo cultivo en estereoscopio (En metodología yo no encontré descripción de estereoscopio. ¿Esto es parte de un microscopio?). (C) Observación del micelio en de un cuadro de agar del mismo cultivo al microscopio en 10x.	34
Figura 8. Observación al microscopio de un cultivo de 3 semanas del aislado de CMP4 en un objetivo 40x. se pueden observar las hifas septadas, la pared celular, y los conidios teñidos con azul de lactofenol.	35
Figura 9. Micro cultivo del aislado CMP4 en un cuadro de agar de PDA, y una micrografía de este a 10x teñido con azul de lactofenol.	37
Figura 10. Micro cultivo del aislado fúngico teñido con azul de lactofenol y visto en microscopio óptico a 40x. Se destacan los septos en las hifas, las macroconidias de forma de medialuna característica para el género <i>Fusarium</i> (A) y los cuerpos fructíferos de los cuales se desprenden los conidios (B).....	38

Figura 11. Gel de agarosa al 1 % de la amplificación de una muestra de ADN del aislado fúngico de CMP4, se observa en el primer carril el marcador de pares de bases desde 1,000 pb hasta 100 pb; en el segundo carril la muestra de ADN purificada amplificada en un rango entre 500 y 600 pb y en el tercer carril se cargó el control negativo (agua) sin amplificar.....	39
Figura 12. Electroferograma de la secuenciación de Sanger del aislado de CMP4 de la amplificación del fragmento ITS con los cebadores ITS1F e ITS4.	40
Figura 13. Evidencia del tratamiento del aislado fúngico con nanopartículas de plata. En el panel A se observan los tubos rotulados de acuerdo con su respectiva solución tratada y número de repetición antes de agregarles las nanopartículas de plata. En el panel B se observan las diluciones seriadas de AgNPs antes de colocarlas en sus respectivos tubos y en el panel C, se observa un tubo con su cubierta de aluminio para impedir el paso de la luz al tubo y evitar la oxidación.	42
Figura 14. Tubos con el aislado fúngico tratado con AgNPs después de 15 días de agitación. En el panel 1 se muestra el tratamiento A, correspondiente a una concentración de AgNPs de 10 mM; en el panel 2, el tratamiento B (1 mM); en el panel 3, el tratamiento C (100 μ M); en el panel 4, el tratamiento D (10 μ M); en el panel 5, el tratamiento E de la biomasa en PDA; y en el panel 6, el tratamiento del aislado en agua destilada estéril....	43
Figura 15. Peso medio de los tubos con solución de biomasa tratada con AgNPs a diferentes concentraciones obtenido en gramos y sus controles durante los 15 días del experimento.....	43
Figura 16. Re-inóculo de la biomasa tratada con AgNPs en PDA, por picadura para revisión de viabilidad. En el panel A, se encuentran los diferentes tratamientos (Tratamiento A, B y C en la parte superior y D, E y F en la parte inferior de cada panel respectivamente.....	44
Figura 17. Conteo de esporas teñidas con azul de lactofenol a 40x en cámara de Neubauer. Se observa en los paneles los cuadrantes correspondientes a una muestra del tratamiento C y E respectivamente con su ampliación.....	45
Figura 18. Cantidad media de esporas obtenida en los diferentes tratamientos en 100 mg de biomasa filtrada en sus respectivos tratamientos.	46

Figura 19. Germinación de las semillas de maíz Chalqueño como prueba de vigor del lote utilizado en este experimento al 5 día.	47
Figura 20. Porcentaje de semillas germinadas del grupo utilizado en el presente experimento, por cada repetición (1ª, 2ª y 3ª).	47
Figura 21. Prueba de patogenicidad en plántulas de maíz Chalqueño utilizando del aislado fúngico de CMP4 (<i>Fusarium verticillioides</i>). En el Panel A se observan las plántulas al día 0 de la inoculación y en el panel B, se observan las plántulas al día 14. Se observan las etiquetas 1,2,3 indicando la repetición a la que pertenecen y la letra N como control negativo (no inoculado).....	48
Figura 22. Evidencia del recubrimiento de las semillas con biomasa tratada con AgNPs. Panel A: Muestras de biomasa tratada en metilcelulosa. Panel B: Semillas de maíz Chalqueño recubiertas con biomasa tratada. Cada una etiquetada con su respectivo tratamiento.....	49
Figura 23. Porcentaje de germinación después de los diferentes tratamientos y el control de semillas sin tratamiento (CTRL (-)).	50
Figura 24. Longitud de la raíz, tallo y hoja de las semillas germinadas en los diferentes tratamientos de aislado fúngico con y sin AgNPs, y el control negativo de plántulas sin tratamiento en centímetros al finalizar los 60 días del experimento.	51
Figura 25. Esquema de comparación por parejas de las medias para los diferentes porcentajes de germinación de las semillas sometidas a los diferentes tratamientos	58

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
μL	Microlitros
μM	Micromolar
μm	Micrómetros
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgNPs	Nanopartículas de plata
ANOVA	Análisis de Varianza
ATP	Adenosín Trifosfato
C	Clavicipitaceo
CFIA	Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
CMP4	Cuyotomate Maíz PDA 4
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
HLB	Enfermedad Huanglongbing
ITS	Región espaciadora interna transcrita
Kb	Kilo bases
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NC	No Clavicipitaceo
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa dextrosa
PDB	Caldo papa dextrosa
PLAL	Ablación con láser pulsado en líquido

PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Revoluciones por minuto
RSA	Resistencia Sistémica Adquirida
RSI	Resistencia Sistémica Inducida
Sp.	Especie

RESUMEN

En México, el maíz es fundamental tanto económica como culturalmente, y la diversidad de razas nativas, como el maíz Chalqueño, es notable. Sin embargo, la producción de estas razas se ve afectada por condiciones ambientales adversas. Este estudio explora el uso de hongos endófitos y nanopartículas de plata (AgNPs) como una estrategia biotecnológica para mejorar la germinación y el vigor del maíz Chalqueño.

El proyecto se enfocó en el hongo endófito CMP4, identificado como *Fusarium verticillioides*, cultivado en medios enriquecidos con nanopartículas de plata "BioArgovit®". Se llevaron a cabo pruebas con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata para evaluar su efecto en el crecimiento del hongo y, posteriormente, en la germinación de las semillas de maíz tratadas con el hongo.

Los hallazgos indicaron que las nanopartículas de plata (AgNPs), particularmente a una concentración de 1 mM, tuvieron un impacto notable en el incremento de la biomasa fúngica. Las semillas tratadas con el hongo expuesto a las AgNPs presentaron una tasa de germinación mayor comparada con las semillas no tratadas, destacándose la concentración de 10 μ M de AgNPs como efectiva para mejorar la germinación.

Estos hallazgos sugieren que las nanopartículas de plata pueden interactuar positivamente con hongos endófitos para mejorar la germinación del maíz Chalqueño. La combinación de AgNPs con *F. verticillioides* se presenta como una solución innovadora y prometedora para enfrentar los desafíos de la agricultura contemporánea y mejorar la productividad de cultivos importantes como el maíz Chalqueño.

ABSTRACT

In Mexico, maize is fundamental both economically and culturally, and the diversity of native breeds, such as Chalqueño corn, is notable. However, the production of these breeds is affected by adverse environmental conditions. This study explores the use of endophytic fungi and silver nanoparticles (AgNPs) as a biotechnological strategy to improve the germination and vigor of Chalqueño maize.

The project focused on the endophytic fungus CMP4, identified as *Fusarium verticillioides*, grown in media enriched with "BioArgovit®" silver nanoparticles. Tests were carried out with different concentrations of silver nanoparticles to evaluate their effect on the growth of the fungus and, subsequently, on the germination of corn seeds treated with the fungus.

The findings indicated that silver nanoparticles (AgNPs), particularly at a concentration of 1 mM, had a notable impact on increasing fungal biomass. Seeds treated with the fungus exposed to AgNPs had a higher germination rate compared to untreated seeds, with the concentration of 10 μ M of AgNPs standing out as effective in improving germination.

These findings suggest that silver nanoparticles can positively interact with endophytic fungi to improve the germination of Chalqueño corn. The combination of AgNPs with *F. verticillioides* is presented as an innovative and promising solution to face the challenges of contemporary agriculture and improve the productivity of important crops such as Chalqueño maize.

1 INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria a nivel mundial se ve afectada por los cambios ambientales y el crecimiento poblacional acelerado. El estrés biótico y abiótico que afecta a los cultivos tiene un impacto negativo en su desarrollo y producción de alimentos. En este contexto, la nanotecnología ha emergido como una herramienta agrícola fundamental. Los avances en nanomateriales han comprobado que son eficaces para reducir la pérdida de nutrientes en el suelo. (Abasi et al., 2022). Al innovar en agroquímicos y en sistemas de liberación de compuestos activos, la nanotecnología ofrece la oportunidad de reducir y optimizar el uso de productos convencionales como los pesticidas, al tiempo que fortalece la resistencia de los cultivos frente a plagas y enfermedades. Investigaciones recientes indican que concentraciones bajas de nanopartículas de plata tienen un efecto beneficioso en la germinación de semillas y fomentan su crecimiento (Rai et al., 2021).

Entre los métodos sostenibles para la síntesis de nanopartículas, destaca el uso de microorganismos y plantas como alternativa más efectiva, amigable con el medio ambiente y no tóxica en comparación con la síntesis fisicoquímica convencional. Esto se debe a que los materiales biológicos son más accesibles y requieren menos procesamiento (Tariq et al., 2022).

En conjunto con el uso de microorganismos endófitos, en particular los hongos endófitos que pueden colonizar plantas durante todo o una parte significativa de su ciclo de vida, se forma una asociación beneficiosa planta-hongo. Esta simbiosis confiere a la planta protección contra el estrés mediante diversas estrategias (Ebrahimi et al. 2022). Este estudio se centrará en el efecto de la mejora potenciada del maíz nativo de México y en la identificación de sus endófitos.

2 ANTECEDENTES

2.1 *Zea mays*

De acuerdo con la información proporcionada por la Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos (CFIA 2021), el maíz se caracteriza por ser una planta anual de gran altura, con un tallo principal y ocasionalmente de 1 a 2 ramificaciones laterales. Sus hojas son anchas, dispuestas verticalmente en dos hileras, con superficies peludas y envés lampiño. El número y tamaño de las hojas varía de una variedad a otra. El maíz es monoico, con flores masculinas (mazorcas) y flores femeninas (mazorcas) separadas en la misma planta. Las mazorcas de maíz están cubiertas de cáscaras e hilos de seda que capturan el polen para la fertilización. Hay hileras de flores en la espiga y, después de la fertilización, cada flor se convertirá en un grano. El maíz viene en una variedad de colores con diferentes propiedades físicas y químicas, incluido el maíz partido, el maíz pedernal, el maíz rosado, el maíz para palomitas de maíz y el maíz dulce. El sistema de raíces consta de raíces ortopédicas estacionales y raíces pivotantes. En la tabla 1 que sigue, se detalla su clasificación taxonómica.

Tabla 1. Taxonomía de *Zea mays* (CFIA 2021).

Categoría	Descripción
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Subclase	<i>Commelinidae</i>
Orden	<i>Cyperales</i>
Familia	<i>Poaceae</i>
Subfamilia	<i>Panicoideae</i>

Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>Zea Mays</i>

El maíz (*Zea mays*) del griego *Zea*, que significa “que sustenta vida” y *Mays* del taíno, que significa “dador de vida” (Rouf Shah et al. 2016); Según la información proporcionada por FAOstat (2021), el maíz en forma de grano seco es uno de los cultivos más extendidos a nivel mundial, ocupando el segundo lugar en términos de cultivo después del trigo. En las últimas dos décadas y media, la producción de maíz ha aumentado un 118 %, impulsado por un incremento del 50 % en el rendimiento y un aumento del 46 % en el área cultivada. Comparado con el arroz y el trigo, el maíz ha experimentado un aumento anual del 2 % en su rendimiento (Erenstein et al., 2022). En México, el maíz juega un papel crucial tanto en la producción como en el consumo agrícola. En el año 2020, fue el cultivo más ampliamente cultivado en todo el país, presente en el 94.6 % de los municipios. Este cultivo ocupó el 52.4 % del área total destinada a cultivos anuales y representó el 33.4 % del valor bruto total de la producción agrícola. En 2022, la producción de maíz en México alcanzó las 27.5 toneladas, con un predominio del 88 % de maíz blanco, el 11 % de maíz amarillo y un 0.4 % de maíz pigmentado. En cuanto al consumo, el maíz es un alimento básico en la dieta mexicana, con los hogares destinando en promedio el 7.2% de su presupuesto alimentario a productos relacionados con el maíz. Las tortillas, elaboradas principalmente con maíz, son una opción muy popular y constituyen el 47 % de la ingesta calórica promedio de los mexicanos, siendo el principal grano cultivado y consumido en sus diversas formas como tamales, tostadas, atole, totopos, botana, tejuino, pinole entre otros (Ramírez-Vega et al. 2022 y Arellano-González, 2023).

Sin embargo, la capacidad productiva de este tipo de hierba se ve restringida por factores tanto bióticos, como diversas plagas y enfermedades, así como abióticos, entre los que se incluyen la sequía, la deficiencia de nutrientes, la salinidad y las altas temperaturas (Grover et al., 2010). Otra problemática relacionada con este cultivo es la erosión genética del germoplasma, ocasionando la pérdida de especies nativas, desde su domesticación, debido a la introducción de monocultivos de variedades mejoradas (Hernández-Salinas et

al. 2022). Aunque también es relevante mencionar que las poblaciones de maíces nativos en posesión de los agricultores han mostrado mejoras en su rendimiento y características agronómicas, lo cual subraya la importancia de desarrollar estrategias de conservación y uso eficiente mediante la aplicación de biotecnología (Ortega-Coronado et al., 2008). Según la CONABIO, las razas nativas son identificadas a partir de sus atributos fenotípicos, tipo de grano, la región donde fueron recolectadas o el nombre otorgado por los grupos indígenas que las cultivaron (2020c). Una característica notable de estas especies es su adaptación precisa a las condiciones ambientales específicas de su región; por ejemplo, una variedad que se desarrolla en la sierra no tendrá éxito en otro tipo de entorno (Hernández, 2019).

Aproximadamente 7,000 especies de plantas cultivadas en Mesoamérica han sido domesticadas, pero solo 30 contribuyen al 90% de la seguridad alimentaria global. En México, *Z. mays* es una especie nativa que fue domesticada y diversificada por las culturas prehispánicas (Hernández-Salinas et al. 2022), cultivada por los mayas en milpas, con su ancestro el teocintle (Caballero-García et al. 2019). En la actualidad, el uso de recursos genéticos de maíz condujo a la clasificación racial de maíz (Perales y Golicher, 2014), por lo que Anderson y Cutler propusieron una clasificación que reflejara la historia y relaciones de sus grupos constituyentes (1943). Después, Wellhausen et al. propusieron clasificar en cuatro grupos y tres subrazas a partir de su estudio detallado de 25 razas de maíz mexicano, considerando características vegetativas de la planta, espiga y mazorca, así como rasgos fisiológicos, genéticos y citológicos (1951). En la tabla 2 se detallan algunas características de estos grupos según lo descrito por Kato et al. (2009). En este estudio, se focalizará en el maíz chalqueño, y se profundizará en esta raza en el próximo apartado.

Tabla 2. Diferentes grupos de razas de maíz en México.

Grupo	Miembros del grupo	Distribución geográfica	Características de la mazorca
Grupo I	Cónico norteño, Chalqueño,	Regiones elevadas en el centro y norte	Forma cónica

	Palomero Toluqueño, Cacahuacintle, Dulce, Arrocillo, Cónico	del territorio nacional.	
Grupo II	Jala, Tabloncillo, Bolita.	Zonas de altitud media con clima de temporal y áreas semiáridas costeras con riego.	Con ocho hileras de grano.
Grupo III	Tuxpeño, Celaya, Nal-tel, Vadeño, Olotillo, Tehua, Olotón, Zapalote chico, Zapalote grande, Tepecintle y comiteco.	Regiones elevadas y de altitud media en el sur de México.	Forma cilíndrica, con base abultada y contiene 12 o más hileras de granos.
Grupo IV	Chapalote y Reventador	Chapalote y afines	Textura de grano cristalino.

2.1.1 Maíz Chalqueño

Según la CONABIO, la raza de maíz Chalqueño es parte del grupo de razas cónicas. Las variedades de este grupo comparten mazorcas de forma cónica con un alto número de hileras de grano, que varían entre 14 y 20. Los granos tienen un ancho de 4 a 8 mm y una textura que puede ser desde harinosa hasta adecuada para palomitas. Además, presentan un número reducido de ramas en la espiga, un sistema de raíces débil, hojas caídas y vainas de hojas fuertemente pubescentes con presencia de antocianina (2020b).



Figura 1 Maíz de raza Chalqueño. Fotografía de Juan M. Martínez Vargas (CONABIO, 2020a).

Es de las más productivas ya que se obtiene a partir de ella una gran cantidad de biomasa debido a sus mazorcas grandes y cónicas con muchas hileras de granos. Además, tiene un alto porcentaje de germinación y es resistente a sequía en diferentes etapas de su crecimiento. Es una raza polimórfica (su textura puede ser harino a semidentado y semi cristalino) y puede presentar diferentes pigmentaciones (blanco, amarillo, rojo, rosado y azul). Cada variante de la raza se asocia a un uso en específico, Por ejemplo, los de color crema se utilizan en la producción de tortillas, los de tipo "palomo" son preferidos para la elaboración de tamales, los maíces "azules" y "rojos" son destinados a la preparación de antojitos, golosinas y pinole, mientras que los maíces amarillos son empleados tanto en la producción de tortillas como para forraje. Aunque todas las variantes se pueden usar para forraje. Por otra parte, el Chalqueño se puede encontrar en diferentes estados de la república como Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Hidalgo, Michoacán, Puebla, Oaxaca y Estado de México y Ciudad de México, como se puede observar en la figura 1



Figura 2. Distribución geográfica del maíz de raza Chalqueño en México. En color azul se rellenan los estados en los que se cultiva mayoritariamente esta raza (CONABIO, 2020a).

2.2 Endófitos fúngicos

El hallazgo más antiguo de interacciones entre endófitos y plantas se remonta al descubrimiento de hifas y esporas de hongos en hojas y tallos fosilizados, lo que sugiere una coevolución entre estos organismos (Yan et al., 2019). El término "endófito" deriva del griego "endon" (dentro) y "phyton" (planta) (Schulz y Boyle, 2005). Kumar y Dara, en su trabajo, describen que este término se ha utilizado ampliamente para incluir a aquellos microorganismos capaces de colonizar tejidos de plantas y vivir entre las células en una relación de mutualismo. Los miembros que se pueden considerar dentro del grupo son hongos, bacterias, arqueas y protistas, pero bacterias y hongos han sido los más estudiados (2021), y entre ellos dos, los hongos todavía han sido menos estudiados. No obstante, las relaciones entre hongos y tejidos de plantas son muy diversas, principalmente entre ascomicetos y basidiomicetos, dependiendo de las condiciones del suelo, raíces, clima y distribución geográfica se dará cada tipo de relación endofítica (Hassani et al. 2018). Según las investigaciones de Rodríguez et al., los hongos endófitos se clasifican en dos categorías taxonómicas: clavicipitáceos (C) y no clavicipitáceos (NC). Esto caracterizado por los tejidos colonizados, cantidad de colonización y rango de transmisión

horizontal o vertical. El grupo C ha sido muy bien estudiado y está compuesto de endófitos que viven generalmente en pastos. Mientras que el grupo NC no ha sido tan estudiado, son aquellos que colonizan arriba o debajo de la tierra (2009).

Algunos de los microorganismos pueden ser hongos nativos que habitan en el suelo y que tienen un gran potencial en biodegradación, biolixiviación, biocompostaje, fijación de nitrógeno, mejora de fertilidad en el suelo y producción de hormonas vegetales, afectando de manera directa o indirecta el crecimiento de la planta que los hospeda (Mirsam 2021). A cambio de esto, la planta recibe beneficios como protección a plagas y enfermedades y/o bien puede aumentar la resistencia a estrés biótico y abiótico (Brookes 2017).

En la tabla 3 se muestran algunos trabajos realizados con endófitos fúngicos y bacterianos realizados en maíz, arroz, y trigo, por ser los principales cultivos alimenticios, y otros cultivos en los que se han descrito mejoras en la planta al usar endófitos fúngicos. En dicha tabla se destaca cómo se han realizado trabajos en diversos países con endófitos, incluyendo a México; sin embargo, no se han realizado amplios estudios con endófitos fúngicos en maíz.

Tabla 3. Actividad biológica de endófitos fúngicos y bacterianos en diversos tipos de cultivos y su actividad biológica en diferentes regiones del mundo.

Endófito (Tipo)	Tipo de Cultivo	Actividad biológica	Zona/ Lugar o país	Referencia
<i>Trichoderma koningii</i> y <i>Alternaria alternata</i> (Hongos)	Maíz	Fungicida contra <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium pallidoroseum</i> , <i>F. verticillioides</i> , y <i>Cladosporium herbarum</i> .	Ondo, Nigeria	Adejumo y Orole. (2008)
<i>Enterobacter sp.</i> , <i>Methylobacteria sp.</i> , <i>Pantoea sp.</i> y <i>Pseudomonas sp.</i> (Bacterias)	Maíz	Estimular el crecimiento de las plantas, crecer en medios libres de nitrógeno, solubilizar fosfato, secuestrar hierro, secretar ARNasa, antagonizar patógenos, catabolizar el precursor de etileno, producir auxina y acetoína/butanodiol	Ontario, Canadá	Jonhston-Monje y Raizada (2011).
<i>Fusarium sp</i> , <i>Trichoderma sp</i> , <i>Acremonium sp</i> , <i>Aspergillus sp</i> , <i>Penicillium sp</i> , and <i>Botryodiplodia sp.</i> (Hongos)	Maíz	No descrita	Sur de Sulawesi, Indonesia	Amin, N. (2013)

<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Acitenobacter sp.</i> , <i>Enterobacter sp.</i> y <i>Sinorhizobium sp.</i> (Bacterias).	Maíz	Crecimiento de plantas y manejo de enfermedades bajo estrés por sequía.	India	Sandhya et al. (2016)
<i>Exophiala pisciphila</i> (Hongo)	Maíz	Disminución de la fitotoxicidad del cadmio y aumento significativo del crecimiento del maíz	Kunming, Yunnan, China	Wang et al. (2016)
<i>Bacillus sp</i> , <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Sinorhizobium sp.</i> (Bacterias)	Maíz	Resistencia a sequia	El batán, Edo, de México.	Sanchez- Bautista et al. (2017)
<i>B. bassiana</i> (Hongo)	Maíz	Crecimiento de plantas y protección contra <i>Rachiplusia un</i>	La plata, Argentina	Russo et al. (2019)
<i>Trichoderma asperellum</i> , <i>Chaetomium subaffine</i> y <i>Chaetomium cochliodes</i> (Hongos)	Maíz	Barrera biológica contra <i>Magnaporthiopsis maydis</i>	Norte de Israel	Degani, et al. (2021)

Hongos nativos (no identificados)	Maíz	Supresión de <i>Fusarium verticillioides</i>	Sulawesi, Indonesia	Mirsam et al. (2021)
<i>Acremonium sp</i> y <i>Penicillium simplicissimum</i>	Maíz y Arroz	Protección Anti patógena	Montana, Estados Unidos	Potshangbam et al. (2017)
<i>Phoma glomerata</i> , <i>Paecilomyces formosus</i> (Hongos)	Arroz	Mejora en altura de la planta, peso fresco y seco y contenido de clorofila.	Daegu, Corea del Sur	Waqas et al. (2013)
<i>Chaetomium sp.</i> (Hongo)	Arroz	Aumento significativo de la supervivencia y el crecimiento de brotes y raíces bajo estrés por calor	Desierto de Thar, India	Sangamesh et al. (2017)
<i>Bacillus testaceum</i> , <i>Bacillus barbaricus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> (Bacterias)	Arroz	Mejora en la altura de brotes, número de macollos, largo de hojas, número de panículas y semillas por planta, biomasa seca de toda la planta y el rendimiento	Jorhat, Assam, India.	Borah et al. (2018)
Hongos mitospóricos de <i>Ascomycota</i>	Trigo	Mejora la germinación de semillas de trigo bajo estrés por calor y sequía	Saskatchewan, Saskatoon, Canada	Hubbard et al. (2014)

<i>Curvularia sp</i> (Hongo)	Trigo	Mejora la resistencia al calor	Jhalawar, India	Chhipa y Deshmukh (2017).
<i>Penicillium roqueforti</i> (Hongos)	Trigo	Mejora la tolerancia al estrés y la absorción de nutrientes en plantas de trigo cultivadas en suelos contaminados con metales pesados	Pakistán	Ikram et al. (2018)
<i>Beauveria bassiana</i> (Hongo)	Tomate y algodón	Competencia espacial con patógenos <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Pythium myriotylum</i>	Tennessee, Estados Unidos	Ownley et al. (2008)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Hongos)	Café	Actividad contra plagas y patógenos	Veracruz, México	Saucedo-García et al. (2014)
<i>Alternaria sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Colletotrichum sp.</i> , y <i>Neoscytalidium</i> (Hongos)	Manzana	Actividad Antifúngica (Contra <i>Venturia inaequalis</i>)	Norte de Iran	Ebrahimi et al. (2022)
<i>Epichloë bromicola</i> (Hongo)	Cebada	Mejora el crecimiento de las plantas bajo estrés salino	Gansu, China	Wang et al. (2022)

2.2.1 Tipos de mecanismos de acción de los endófitos benéficos en plantas

Los endófitos fúngicos han sido estudiados desde hace más de 100 años, con el primer endófito aislado (*Lolium temulentum* L.) en 1898, y posteriormente con mayores descubrimientos, los cuales llamaron la atención a micólogos y farmacéuticos por ser una nueva fuente de sustancias bioactivas y metabolitos (Wen et al. 2022).

Desde entonces, se ha demostrado que los microorganismos endófitos tienen un efecto positivo a través de mecanismos como el antagonismo, la resistencia sistémica inducida (RSI), la resistencia sistémica adquirida (RSA), y la promoción del crecimiento, entre otros (Liu et al. 2012). Mientras que, en el trabajo de Yan et al. (2019) se explica que los mecanismos de acción benéfica mediada por endófitos se pueden clasificar de dos maneras en función del tipo de estrés que esté mediando. En la figura 2 se pueden resumir las estrategias mediante las cuales los endófitos benefician a su hospedador.

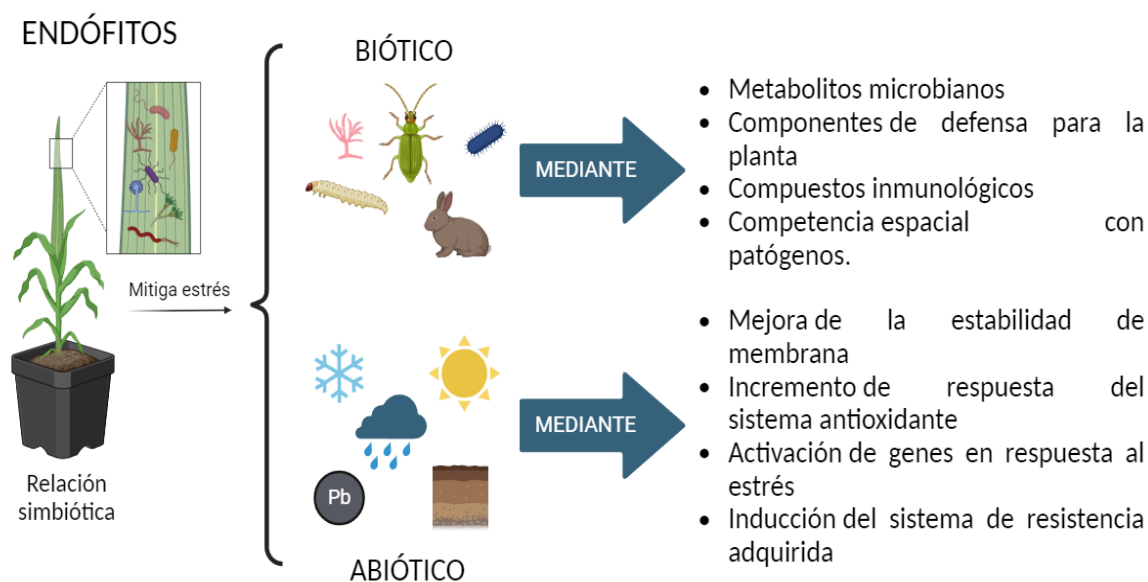


Figura 3. Resumen conciso del papel de los endófitos en las plantas frente a condiciones de estrés biótico y abiótico, según Yan et al. (2019).

2.3 Nanopartículas de plata:

Los sistemas agrícolas a nivel mundial están enfrentando desafíos extraordinarios debido al cambio climático. Para enfrentar estos desafíos, las tecnologías y productos basados en nanotecnología tienen el potencial de mejorar notablemente el rendimiento y la

sostenibilidad de los cultivos, lo que a su vez contribuye a fortalecer la seguridad alimentaria. La nanotecnología permite mejorar la eficiencia de los recursos agrícolas y reducir las pérdidas. Las nanopartículas tienen una alta relación superficie-volumen debido a su tamaño extremadamente pequeño. Esto significa que hay más área superficial disponible para interactuar con otros materiales, a diferencia de pesticidas y fertilizantes. mejorando la entrega controlada de nutrientes en ubicaciones específicas para una mejor protección de los cultivos. Los nanobiosensores facilitan la gestión y el control precisos de insumos como fertilizantes y pesticidas, impulsando el desarrollo de campos agrícolas altamente tecnificados. La nanotecnología se ocupa de átomos o moléculas en el rango de tamaño nanométrico, donde las propiedades únicas, como la reactividad química y las propiedades mecánicas, son más destacadas (Shang et al. 2019; Ali et al. 2021).

Las nanopartículas tienen el potencial de proporcionar diversos beneficios a la agricultura, tales como incrementar la productividad de los cultivos, mejorar la salud nutricional de las plantas, controlar plagas y patógenos, mitigar el estrés causado por factores ambientales y proteger contra la radiación UV. Además, pueden contribuir a mejorar la calidad del suelo y del agua, así como aumentar la productividad de la biomasa y acelerar la germinación de las semillas (Shukla et al., 2024). La germinación de las semillas es un momento crucial y sensible en el ciclo de vida de las plantas, y la aplicación de nanotecnología ha mejorado este proceso al favorecer el crecimiento de los cultivos y aumentar la tasa de éxito reproductivo. A nivel global, numerosos estudios experimentales han confirmado la eficacia del uso de nanopartículas metálicas en la germinación y desarrollo de las plantas (Manjaiah et al., 2019).

2.3.1 Uso de nanopartículas de plata en plantas:

Las nanopartículas de plata (AgNPs) ejercen varios impactos en los cultivos, especialmente en los cereales. Estudios recientes han demostrado que las AgNPs pueden afectar negativamente el crecimiento de las raíces, pero también tienen efectos beneficiosos, como la reducción del tizón en las plántulas y la mejora del área foliar en plantas de trigo (Matras et al. 2023).

El tamaño de las nanopartículas de plata (AgNPs) es fundamental; las partículas más pequeñas pueden afectar el crecimiento de las raíces de las plántulas y modificar los

niveles de carbohidratos, particularmente las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa (Lahuta et al., 2022). Además, la aplicación de AgNPs puede aumentar la longitud de las plántulas aéreas, inhibir hongos patógenos y elevar los niveles de clorofila y carotenoides en los cultivos de cereales, lo que en última instancia mejora la producción agrícola (Hoang et al. 2022). A pesar de esto, las nanopartículas de plata (AgNPs) también tienen la capacidad de suprimir el crecimiento del coleóptilo en el trigo, lo que puede resultar en anomalías en las raíces. Además, provocan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y afectan el metabolismo primario y la movilización de materiales de almacenamiento (Lahuta et al., 2022). En conjunto, los efectos de las AgNPs en los cultivos de cereales son complejos, influyendo en diversos aspectos fisiológicos y en el rendimiento general de los cultivos.

Con relación al maíz, se ha comprobado que las nanopartículas de plata (AgNPs) tienen impactos significativos en su desarrollo. La síntesis de AgNPs mediante diversos métodos, como extractos de hojas y *Funaria hygrometrica*, ha demostrado mejorar el crecimiento y la germinación del maíz, aumentando la longitud de las raíces y los brotes, así como el peso fresco y la materia seca de las plántulas (Hussain et al., 2023; Karim et al., 2023). Además, se ha observado que las AgNPs reducen la acumulación de metales tóxicos en las raíces y brotes del maíz, mejoran la actividad antioxidante, y aumentan los niveles de carotenoides y clorofila, al tiempo que disminuyen los niveles de malondialdehído, contribuyendo así a la salud general de las plantas de maíz (Chen et al., 2023). También se ha constatado que la aplicación de AgNPs tiene efectos positivos en el área foliar, la altura de las plantas y el contenido de clorofila en el maíz, lo que sugiere su potencial para mejorar las características de las plantas y controlar plagas como *Sesamia cretica* (Adejumo et al., 2023).

2.3.2 Tipos de síntesis de AgNPs

Existen dos principales categorías de métodos para la síntesis de nanopartículas: los enfoques top-down y bottom-up. Los métodos top-down incluyen procesos químicos y biológicos de producción que reducen el tamaño de los agregados del material hasta alcanzar dimensiones nanométricas. Por otro lado, los métodos bottom-up son métodos químicos en disolución coloidal, donde las nanopartículas se forman a partir de una

disolución. Dentro de estas categorías, los métodos físicos y químicos a menudo se consideran tóxicos, mientras que los métodos biológicos generalmente se consideran no tóxicos (De La Caridad Esquivel-Figueroa et al. 2021).

Los métodos físicos para sintetizar nanopartículas de plata incluyen la ablación con láser pulsado en líquido (PLAL) (Ganash, 2022). Este es un enfoque simple y ecológico que permite la producción de nanopartículas de diversos tamaños mediante el ajuste de los parámetros del láser o la modificación de las propiedades del solvente de ablación. Un método físico adicional es emplear radiación de microondas para sintetizar nanopartículas de plata, utilizando cáscaras de plátano como agente reductor y estabilizador. Este método ha demostrado ser rápido, ecológico y rentable, además de requerir tiempos de extracción y reacción más cortos en comparación con los métodos de calefacción convencionales (Cekuolyte et al. 2023). Estos enfoques físicos ofrecen métodos eficaces para generar nanopartículas de plata con características físicas y químicas especiales, ideales para diversas aplicaciones como la terapia antimicrobiana, la purificación del agua y dispositivos médicos. Así, contribuyen significativamente a los avances en la nanociencia y la nanotecnología (Phoemthaisong et al. 2023; Devadharshini et al. 2023).

Los métodos químicos para la síntesis de nanopartículas de plata abarcan enfoques sol-gel, sonoquímicos y métodos químicos tradicionales. La síntesis sol-gel produce cristales de óxido de plata puro con tamaños de cristallitos y partículas pequeños y una gran superficie específica (Devadharshini et al. 2023). Los métodos sonoquímicos resultan en alta cristalinidad y homogeneidad de tamaño en comparación con otros métodos (Akhatova et al. 2023). Los métodos químicos tradicionales implican la reducción y estabilización de iones metálicos mediante agentes químicos, lo que lleva a la formación de nanopartículas de plata con características específicas (Maesaroh et al. 2023). Estos métodos químicos ofrecen ventajas variadas en términos de pureza, control del tamaño y área de superficie, lo que contribuye a las diversas aplicaciones de las nanopartículas de plata en campos como la medicina, la cosmética y la agricultura (Chaudhary et al. 2023; Olga et al. 2002).

Dentro de los métodos biológicos para la síntesis de nanopartículas, se pueden emplear técnicas como la fitosíntesis utilizando extractos de raíces, semillas, frutos o hojas, así

como la síntesis microbiana que involucra bacterias, hongos, levaduras y algas (Jain et al. 2021).

Las AgNPs se sintetizan en microorganismos mediante métodos biogénicos, utilizando bacterias, hongos y bacterias endofíticas aisladas de plantas como *Pennisetum setaceum*. Estos microorganismos ofrecen ventajas como alta formación de proteínas, manipulación sencilla, menor toxicidad y alto rendimiento, lo que lleva a la producción de AgNPs con aplicaciones versátiles en diversos campos (Surega et al. 2020; Habibullah et al. 2021 y Rajeshkumar et al. 2022). Durante el proceso de síntesis, se reduce iones metálicos a nanopartículas, donde factores como el potencial de reducción, la estructura de las proteínas y el tipo celular afectan la distribución del tamaño y la cristalinidad de las nanopartículas (Ahmed et al., 2019). La síntesis biogénica de AgNPs utilizando microorganismos se considera rentable, ecológica y capaz de producir nanopartículas con tamaños y formas bien definidas, adecuadas para la producción a gran escala sin generar desechos tóxicos (Tortella et al. 2022).

2.3.3 Nanopartículas de plata en el manejo de estrés biótico y abiótico en plantas:

Las nanopartículas también han sido evaluadas como agentes capaces de mitigar el estrés biótico y abiótico en las plantas. Según los informes, se ha demostrado que pueden aliviar el estrés causado por la sequía, el calor y la salinidad, además de mejorar el crecimiento en altura de las plantas, tanto en peso seco como fresco, y promover la fotosíntesis (Abasi et al., 2022).

Los efectos que pueden tener las AgNPs en bacterias fitopatógenas se han estudiado ampliamente. Se ha demostrado que las AgNP sintetizadas a partir de diferentes fuentes, como el alginato de sodio modificado con aldehído, el extracto de raíz de calabaza espinosa y las especies de hongos, alteran las membranas celulares bacterianas, lo que provoca fugas citoplasmáticas (Jiang et al. 2022, Naik & Devi, 2021 y Alavi & Ashengroph, 2023). Además, se conoce que las AgNPs inducen estrés oxidativo, disfunción proteica, daño al ADN y alteran la adhesión bacteriana para prevenir la formación de biopelículas, lo que en última instancia causa la muerte bacteriana (More et al., 2023).

Por otro lado, las AgNPs han demostrado ser efectivas contra virus, hongos y nematodos fitopatógenos a través de diversos mecanismos. Estas nanopartículas pueden eliminar microorganismos al interactuar con sus superficies, desestabilizando las paredes celulares y membranas mediante la liberación de iones metálicos, y generando toxicidad a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (Kanakari & Dendrinou-Samara, 2023). La biosíntesis de AgNPs en especies fúngicas implica la reducción de iones Ag^+ y la estabilización de las nanopartículas mediante diversos metabolitos y compuestos, lo cual potencia sus propiedades antimicrobianas (Alavi & Ashengroph, 2023). Asimismo, las AgNPs sintetizadas a partir de extractos vegetales han mostrado efectos antiparasitarios notables, inhibiendo de manera eficaz la proliferación de parásitos (Zhang et al., 2023). Mientras que, las AgNPs derivadas de diversas especies fúngicas han exhibido una actividad antifúngica significativa contra cepas clínicas de *Candida* y fitopatógenos, lo que resalta su potencial como agentes antifúngicos efectivos (Ribeiro et al., 2023). Estos resultados subrayan los variados mecanismos a través de los cuales las AgNPs combaten virus, hongos y nematodos fitopatógenos, y evidencian su prometedor rol en la agricultura y el manejo de enfermedades de plantas.

2.3.4 Toxicidad de las nanopartículas de plata

Las nanopartículas tienen distintos niveles de toxicidad según su tamaño, forma, recubrimiento y concentración. Las más pequeñas son absorbidas más fácilmente y tienen un mayor impacto biológico. El recubrimiento afecta su toxicidad, por lo que usar biomoléculas como recubrimiento puede reducir su toxicidad y mejorar su uso en aplicaciones biológicas (Rai et al. 2021).

Las AgNPs tienen efectos tóxicos tanto en los cultivos como en los seres humanos. En cultivos, las AgNPs pueden ser absorbidas por las plantas tanto a través de la exposición foliar como radicular, lo que resulta en una reducción de la biomasa y un incremento en los indicadores de estrés oxidativo (Li y Cummins, 2022). El impacto de las AgNPs en las plantas terrestres varía según la concentración, el método de exposición y la especie de planta. Concentraciones superiores a 12 mg/L pueden causar respuestas tóxicas diferenciales (Li et al. 2017).

Sin embargo, cuando las nanopartículas de plata (AgNPs) se emplean en fertilizantes, han mostrado efectos positivos en la salud de las plantas al reducir la infestación de patógenos, incrementar el contenido de clorofila y mejorar los rendimientos, especialmente bajo condiciones de estrés. Esto indica su potencial en prácticas de agricultura sostenible (Sami et al., 2020).

En los seres humanos, la naturaleza bioactiva de las AgNPs plantea preocupaciones sobre posibles riesgos para la salud. Los mecanismos de toxicidad incluyen el estrés oxidativo, la activación de la autofagia y la interferencia con las vías de ubiquitinación (Jaskulski et al. 2022). Es crucial comprender estos efectos para gestionar los riesgos vinculados con la exposición a nanopartículas de plata (AgNPs) en entornos agrícolas y humanos.

La figura 3 es un diagrama que resume la información discutida en esta sección, ofreciendo una visión general de los conceptos clave y sus relaciones.

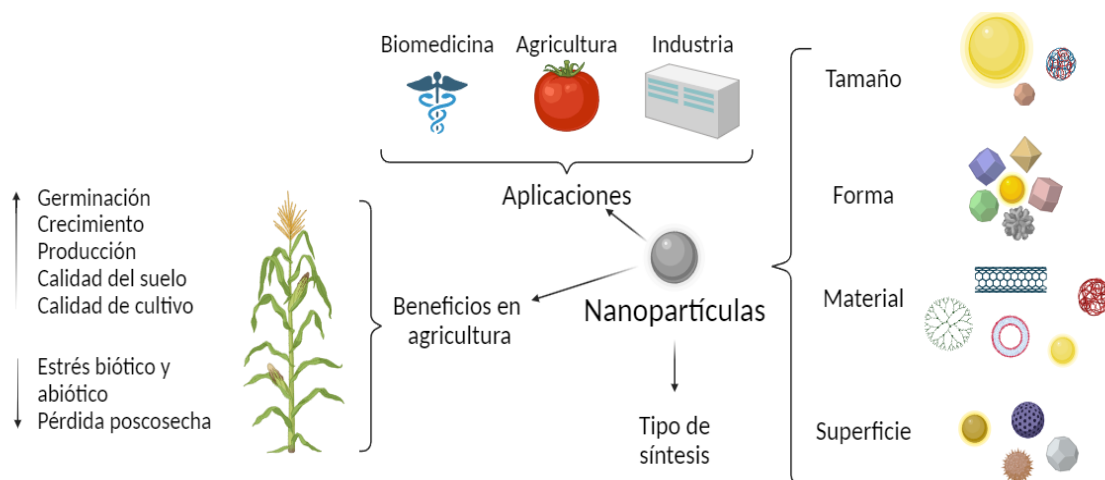


Figura 4. AgNPs; Factores que influyen en su actividad biológica, aplicaciones y efectos en la agricultura (Ali et al. 2021).

2.3.5 Nanopartículas de plata “BioArgovit”

El estudio se centra en un tipo específico de nanopartículas de plata (AgNPs) denominadas BioArgovit, desarrolladas por Vector-Vita. Estas nanopartículas están estabilizadas con polivinilpirrolidona (PVP) y colágeno hidrolizado, tienen un tamaño promedio de 15 nm y presentan una alta concentración de plata metálica (12 mg/ml) y de formulación total de plata metálica con estabilizadores (200 mg/ml) (Bogdanchikova et al. 2024).

2.3.5.1 Aplicaciones en Agricultura:

Argovit ha encontrado diversas aplicaciones en la agricultura, como se demostró en un estudio realizado por Santoscoy-Berber et al. (2021), donde la aplicación de estas nanopartículas en zanahorias después de la cosecha aumentó notablemente su capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en diferentes concentraciones de AgNPs (0, 5, 10, 20 o 40 mg/L). Esto condujo a una mejora en la producción de compuestos bioactivos beneficiosos para la salud.

En otro estudio sobre limas mexicanas infectadas con la enfermedad Huanglongbing (HLB), se descubrió que el uso de BioArgovit redujo eficazmente el título bacteriano en un 80-90% cuando se aplicó mediante pulverización foliar y inyección en el tronco (Stephano-Hornedo et al. 2020).

2.3.5.2 Historia y Otras Formulaciones:

Argovit™ es una formulación previa de nanopartículas de plata que ha sido utilizada en diversos campos biológicos. Estas nanopartículas han demostrado poseer propiedades antibacterianas, antiparasitarias, antifúngicas y antivirales. Además, Argovit ha sido utilizado en diversos campos como la agricultura, la ganadería y la medicina, incluyendo aplicaciones en tratamientos antitumorales y para el pie diabético, entre otras (Gil Martínez, 2022).

Otro tipo de nanopartículas de plata, conocidas como “BioArgovit®”, también ha sido utilizado en estudios anteriores en el mismo ámbito. BioArgovit® son AgNPs recubiertas con proteína hidrolizada, sintetizadas siguiendo el protocolo descrito en la patente RU2646105C1 "Método para la producción de proteinato de plata". Esta formulación es una suspensión acuosa altamente dispersa con una concentración total de 200 mg/mL (20%) y un contenido de plata metálica de 111,2 mM (12 mg/mL), estabilizada con 188 mg/mL de proteína hidrolizada (Valenzuela-Salas et al. 2021).

2.3.5.3 Investigaciones sobre Citotoxicidad:

En el estudio realizado por González Vega (2022), se recopilaron datos sobre la toxicidad de estas nanopartículas en diversos modelos in vivo. Se evaluaron en una amplia variedad de organismos, que incluyen líneas celulares humanas y animales, así como modelos

primarios de diferentes especies animales. De manera interesante, esta formulación mostró efectos selectivos según los distintos modelos celulares evaluados.

3 JUSTIFICACIÓN

Las variedades nativas de maíz en México son de gran importancia por su diversidad genética, adaptación a entornos específicos y valor cultural. Estudios han confirmado que México es un centro de origen del maíz, con una amplia diversidad de razas (Olvera-Aguilar et al., 2023). Estas variedades desempeñan un papel crucial en la conservación de la agrobiodiversidad y pueden contribuir a la seguridad alimentaria mediante medidas de conservación *in situ* (Hernández-Salinas et al., 2022). Se han destacado la variabilidad morfológica y agronómica de las razas nativas de maíz, evidenciando su potencial para la producción sostenible y la diversificación de la agricultura rural (Santillán-Fernández et al. 2021). Además, las razas nativas de maíz en México exhiben características de calidad superiores en comparación con los híbridos comerciales, lo que indica su potencial para satisfacer las preferencias de los consumidores y mejorar el mercado del maíz en el país (Saenz et al., 2020). En conjunto, la preservación y el uso de estas variedades nativas son fundamentales para mantener la diversidad genética, preservar el patrimonio cultural y promover prácticas agrícolas sostenibles. Por ello, el aumento de su producción es un enfoque prioritario en este proyecto.

Por otro lado, las nanopartículas desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la agricultura al proteger los cultivos, funcionar como bioestimulantes, conferir resistencia al estrés oxidativo y mejorar la calidad del suelo y la degradación ambiental, lo que contribuye a la sostenibilidad de los agroecosistemas (Tariq et al. 2022). Además, Kumar y Dara (2021) explican que probablemente todas las plantas albergan endófitos desde la semilla. Estos microorganismos son reclutados del suelo por las plantas, protegiéndolas de la degradación y la depredación, y se transmiten verticalmente de generación en generación. Por ello, es importante estudiar los endófitos en las semillas.

El presente trabajo busca ampliar el conocimiento sobre el uso de endófitos en conjunto con nanopartículas de plata para favorecer la germinación y el desarrollo de uno de los cultivos más importantes del país. La información recopilada permitirá profundizar en este campo, que hasta ahora cuenta con poca investigación en el contexto de los maíces nativos.

4 HIPÓTESIS

El uso de nanopartículas de plata “BioArgovit®” en el medio de crecimiento para obtener la biomasa del aislado fúngico CMP4, puede mejorar la capacidad del hongo para favorecer la germinación de maíz Chalqueño.

5 OBJETIVO

5.1 Objetivo General:

- Probar que el uso de nanopartículas de plata “BioArgovit®”, en el medio de crecimiento del aislado fúngico CMP4, tiene la capacidad de potenciar el efecto de este hongo en la germinación de maíz Chalqueño.

5.2 Objetivos específicos:

- Identificar el aislado fúngico CMP4 por su morfología y mediante técnicas moleculares.
- Determinar la concentración de las nanopartículas de plata “BioArgovit®” que no afecten el crecimiento del aislado fúngico CMP4.
- Determinar la concentración de las nanopartículas de plata “BioArgovit®” aplicadas al aislado fúngico CMP4, en la cual la biomasa obtenida del hongo potencie el porcentaje de germinación y tamaño de las plántulas de maíz Chalqueño.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Reactivación de la cepa

El aislado fúngico CMP4 fue seleccionado debido a sus características morfológicas, obtenido de hongos previamente aislados en experimentos anteriores realizados en el mismo lugar de trabajo. Este hongo fue aislado de maíz nativo de la región Cuyotomate, cultivado en Agar Papa Dextrosa (PDA), de ahí el nombre del aislado CMP4 (Cuyotomate, Maíz, PDA, #4), y conservado en glicerol al 40% a -70°C. Para la reactivación, se tomaron 20 µL y se sembraron en Agar Papa Dextrosa (PDA), extendiéndolo con un asa e incubándolo en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante 21 días para obtener un cultivo primario.

6.2 Identificación de características morfológicas macroscópicas

Se resembró el hongo a partir de las colonias más aisladas del cultivo primario por picadura en PDA y se incubó a temperatura ambiente en condiciones de ausencia de luz por 15 días. Luego, se realizó la descripción del hongo, se tomaron fotos del cultivo y posteriormente se realizó la conservación de la cepa, en glicerol al 40% a -70°C.

6.3 Identificación de características morfológicas microscópicas

A partir de un cultivo puro obtenido en el paso anterior, se tomó una muestra presionando suavemente con cinta adhesiva transparente sobre el cultivo. Después, se colocó una gota de azul de lactofenol en un portaobjetos, se fijó la cinta con la muestra y se examinaron las características morfológicas utilizando un microscopio Primo Star de Carl Zeiss Fabricado en Göttingen Alemania.

6.4 Identificación del aislado por técnicas moleculares

Para la extracción de ADN, se obtuvo biomasa en medio líquido cortando un cuadro de agar de aproximadamente un centímetro en área a partir del cultivo puro inoculado previamente en PDA y posteriormente se utilizó para inocular un tubo cónico de 50 mL con 30 mL de caldo papa dextrosa (PDB) estéril. Posteriormente, se mantuvo en incubación durante 15 días a temperatura ambiente en un agitador Thermo Scientific MaxQ 2000™ fabricado en EE. UU a 120 revoluciones por minuto (rpm). Después, se centrifugó a 10,000 rpm en una centrífuga Sorvall ST 16R de Thermo Fisher fabricada en Alemania, durante 5 minutos y se separó el sobrenadante para concentrar la biomasa. Se

tomaron 100 μ L de la biomasa y se almacenaron en microtubos cónicos de 1.5 mL a -70°C hasta su uso.

6.4.1 Extracción de ADN

Las muestras de biomasa se centrifugaron a 3,000 rpm por 10 minutos a 4°C en una microcentrífuga de refrigeración Centrifuge 5424 R de Eppendorf fabricada en Hambrugo, Alemania. Luego, se resuspendieron en 1 mL de agua destilada estéril y se centrifugaron nuevamente a 3,000 rpm por 10 minutos a 4°C en la misma microcentrífuga. Posteriormente, se añadieron 500 μ L de buffer NTES (0.2 M Tris-Cl pH 7.6, 0.5 M NaCl, 0.1 SDS y 0.01 M EDTA) y aproximadamente 50 μ L de perlas disruptoras ($d=0.1$ mm). La muestra se agitó en un Vortex Genie 2 de Scientific Industries fabricado en EE. UU. durante 20 minutos, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un microtubo cónico estéril de 1.5 mL. Después, se añadieron 400 μ L de fenol-cloroformo (1:1), se homogeneizó en vortex por 4 minutos y se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C . La fase acuosa se transfirió a otro microtubo de 1.5 mL, al cual se le agregaron 0.1 volúmenes de acetato de amonio y 2 volúmenes de etanol absoluto, incubándolo a -20°C durante la noche.

Al día siguiente, se centrifugó a 15,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El pellet resultante se lavó con etanol frío al 70%, se homogeneizó en vortex durante un minuto y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4°C . Se descartó el sobrenadante y se dejó secar completamente el pellet. Finalmente, se resuspendió el pellet en 500 microlitros de agua libre de nucleasas.

Nota: Para este protocolo, es crucial el tiempo de homogeneización en vortex. Se recomienda usar un soporte para los tubos y manejar con cuidado las perlas disruptoras, que pueden ser abrasivas.

6.2.1 Evaluación de calidad de la muestra

Se analizó la concentración y calidad de ADN en la muestra utilizando un Nanodrop Lite Spectrophotometer Thermo Scientific de Termo Fisher fabricado en China, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó agua desionizada como blanco, la cual también se utilizó para preservar la muestra. Una vez calibrado el equipo, se colocaron 3 μ L de la muestra en el Nanodrop para cuantificar el ADN presente.

6.2.2 Amplificación del segmento ITS1-ITS4

Se procedió con la amplificación de la región ITS utilizando los primers ITS 1 – 5' TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3' (Forward) y ITS 4 – 5'- TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3' (Reverse), sintetizados por Bioline. Se utilizó la enzima MyTaq™ DNA polymerase junto con el buffer correspondiente del fabricante para la solución de reactivos para amplificación.

Se prepararon dos volúmenes de reacción diferentes: uno de 25 µL, utilizado para verificar las condiciones óptimas de PCR y la amplificación del fragmento esperado en cada muestra, y otro de 50 µL, destinado a obtener una mayor concentración del producto de PCR para su posterior purificación y secuenciación. Los volúmenes específicos de cada componente utilizado para la reacción se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Volúmenes de reacciones

Reactivo	Volumen de reacción	
	25 µL	50 µL
5x Buffer	5 µL	10 µL
Mytaq	0.5 µL	1 µL
ITS1	0.5 µL	1 µL
ITS4	0.5 µL	1 µL
H2O	16.5 µL	33 µL
DNA	2 µL	4 µL

Para la amplificación se siguió el protocolo detallado en la tabla 5, utilizando un termociclador T100 Thermal Cycler de Bio-Rad fabricado en Singapur.

Tabla 5. Protocolo de PCR utilizado

Paso	D1	D2	A	E	D2→E	EF	I
Temperatura (°C)	95	95	60	72		72	4

Tiempo (min)	5:00	0:30	0:45	1:30		8:00	∞
-------------------------	------	------	------	------	--	------	----------

D1: Desnaturalización 1, D2: Desnaturalización 2, A: Alineamiento, E: Extensión, EF: Extensión final e I: Incubación.

6.2.3 Purificación del producto de PCR

El producto de PCR se detectó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio a una concentración final de 0.1 mg/mL. El tamaño del amplicón se estimó comparándolo con el marcador de peso molecular HyperLadder™ 100bp de Bioline. Posteriormente, el producto final de la reacción de 50 µL se purificó utilizando el reactivo SureClean Plus de Bioline siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

6.2.4 Identificación molecular mediante secuenciación de Sanger

La muestra purificada se envió para su secuenciación a la Unidad de Servicios Genómicos de LANGEBIO-CINVESTAV, en Irapuato, Gto., México. Se utilizaron los cebadores ITS1 e ITS4 para la secuenciación. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa BioEdit y las secuencias en formato FASTA se compararon con las existentes en la base de datos GenBank para su identificación.

6.3 Tratamiento del aislado fúngico CMP4 con nanopartículas de plata (“BioArgovit®”)

Para la obtención del aislado fúngico, se inoculó previamente el medio PDA en cajas Petri para obtener suficiente biomasa.

6.3.1 Preparación de medios

Se prepararon 6 tratamientos: cuatro soluciones con distintas concentraciones de AgNPs (10 mM, 1 mM, 100 µM y 10 µM) en medio PDB, adicionalmente, un control del hongo suspendido en medio PDB y otro control del hongo suspendido en agua destilada, por triplicado. Para ello, se utilizaron 18 tubos de ensayo de vidrio con taparrosca Pyrex en total, de los cuales se colocaron 12.5 ml de PDB en 12 tubos para los tratamientos con AgNPs, 14 ml de PDB en 3 tubos para un control y 14 ml de agua destilada en 3 tubos para el otro control.

6.3.2 Diluciones de AgNPs

Se utilizaron nanopartículas Argovit- C a una concentración inicial de 1M y se prepararon diluciones para alcanzar las concentraciones finales deseadas (10 mM, 1 mM, 100 μ M y 10 μ M). A cada tubo con 12.5 ml de PDB se le añadieron 1.5 ml de las diluciones correspondientes para cada tratamiento.

6.3.3 Inoculación del medio con nanopartículas

Se obtuvo un gramo de biomasa micelial a partir de cultivos puros, el cual se añadió a los tubos preparados con sus respectivos tratamientos. Estos tubos fueron envueltos en papel aluminio para mantener condiciones de oscuridad y se colocaron en un agitador orbital Thermo Scientific MaxQ 2000™ fabricado en EE.UU. y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 días, agitándolos a 120 rpm. Se registró diariamente el peso fresco de cada tubo utilizando una balanza analítica HR-250AZ de AyD fabricada en Corea de para evaluar el impacto de las nanopartículas de plata en el aislado fúngico CMP4.

6.3.4 Filtrado de la biomasa tratada con nanopartículas

Posteriormente la biomasa fue filtrada por gravedad utilizando embudos de vidrio con papel filtro estéril Whatman 41. La biomasa fresca fue recuperada en microtubos cónicos de 1.5 mL, posteriormente pesada en la balanza analítica HR-250AZ de AyD fabricada en Corea para determinar la cantidad obtenida por tratamiento y almacenada a 4°C hasta su uso.

6.3.5 Preparación de metilcelulosa

Se preparó una solución al 20% de metilcelulosa, agregando gradualmente agua destilada estéril en una plancha de calentamiento a 40°C con agitación constante. La mezcla se agitó hasta obtener una pasta viscosa blanquecina, la cual se almacenó a 4°C durante 24 horas o hasta que la solución se volviera transparente.

Posteriormente, esta solución se combinó con los diferentes tratamientos de la biomasa tratada con nanopartículas para facilitar su adherencia a las semillas de maíz. Se llevó a cabo un conteo en cámara de Neubauer para cada tratamiento y se realizaron diluciones de la biomasa para ajustar una concentración de esporas de 10^6 en un volumen de 15 ml de metilcelulosa al 20%. La mezcla resultante se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.4 Tratamiento de las semillas de maíz con el aislado fúngico tratado con AgNPs

6.4.1 Preparación de las semillas

Se utilizaron grupos de 15 semillas de maíz Chalqueño por tratamiento y replicadas por triplicado dando un total de 270 en total. Inicialmente, las semillas fueron enjuagadas en una solución al 0.5% de hipoclorito de sodio con agitación constante durante 15 minutos. Después, se lavaron con agua destilada estéril durante otros 15 minutos, también con agitación constante, y finalmente se sumergieron en agua destilada estéril durante 15 minutos más, con agitación ocasional. Las semillas se dejaron secar al aire en condiciones estériles y luego se recubrieron con la mezcla de metilcelulosa y hongo tratado previamente preparada, utilizando pinzas estériles. Posteriormente, se colocaron en cajas Petri para su secado, procurando completarlo en un plazo no mayor a 24 horas para evitar el crecimiento inicial del hongo en la superficie de la semilla.

6.4.2 Preparación de la tierra

Se calculó la cantidad necesaria de tierra y peatmoss en una proporción 1:1 en volumen para llenar una maceta. Posteriormente, la tierra necesaria fue sometida a esterilización en autoclave durante 30 minutos y luego se combinó con el peatmoss añadiendo agua hasta alcanzar una consistencia blanda. La mezcla se dispuso en macetas limpias.

6.4.3 Siembra de semillas

En cada maceta se sembró una semilla previamente recubierta con la mezcla de metilcelulosa y biomasa de hongos tratados con nanopartículas en las concentraciones específicas determinadas. Se utilizó pinzas estériles para asegurar que la cara del germen quedara hacia abajo y posteriormente se cubrió la semilla con tierra.

6.5 Determinación del porcentaje de germinación de semillas tratadas con biomasa con AgNPs

Las semillas sembradas se mantuvieron a temperatura ambiente con un ciclo de luz de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se regaron según la necesidad para mantener la humedad inicial del sustrato y se registró diariamente el número de semillas que germinaron durante un período de 15 días. Finalmente, el porcentaje de plántulas germinadas fue calculado como sigue:

$$\% \text{ Germinación} = \frac{\text{Número de plántulas emergidas en el último conteo}}{\text{Número de semillas sembradas}} * 100$$

6.5.1 Determinación del vigor del lote de semillas utilizadas en el experimento

Fue llevado a cabo un ensayo para determinar la viabilidad del lote de semillas utilizado en el experimento. Se colocaron 15 semillas por triplicado en pocillos con algodón humedecido, manteniéndolas a temperatura ambiente con un fotoperiodo 12/12. Se cuantificó el número de plántulas emergidas y se midió su longitud. Posteriormente, se calculó el porcentaje de plántulas siguiendo el mismo método utilizado para calcular el porcentaje de germinación.

6.5.2 Ensayos de fito patogenicidad del aislado fúngico CMP4 en plantas de maíz (in planta)

Las plántulas de maíz Chalqueño obtenidas del ensayo anterior fueron inoculadas con el aislado fúngico CMP4. Se aplicó el aislado en el envés de las hojas utilizando un pincel con grenetina, y se observaron y describieron los efectos resultantes en las plantas.

6.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del aislado fúngico con nanopartículas y de las semillas de maíz tratadas con biomasa y nanopartículas, fueron tratados estadísticamente utilizando el software IBM SPSS 2015 v20. Inicialmente, se realizó una prueba de normalidad para cada grupo de datos obtenidos según la cantidad de datos obtenidos y la muestra poblacional utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Según los resultados de esta prueba, se aplicó un ANOVA para analizar los datos del peso fresco obtenido. Posteriormente, se realizó una prueba de Tukey para comparar las medias y medir la significancia de los tratamientos. Para los datos correspondientes al porcentaje de germinación, debido a la ausencia de normalidad se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de una corrección de Bonferroni para la comparación de medias y medir significancia entre tratamientos.

7 RESULTADOS

7.1 Identificación de características morfológicas macroscópicas y microscópicas del aislado fúngico CMP4

Se observó el desarrollo del aislado fúngico en el medio de cultivo primario, como se evidencia en la figura 4. Las colonias exhibieron un patrón de crecimiento radial y filamentoso, con un diámetro reducido y una elevación central leve, caracterizadas por bordes filiformes y una textura superficial aterciopelada de color rosado.

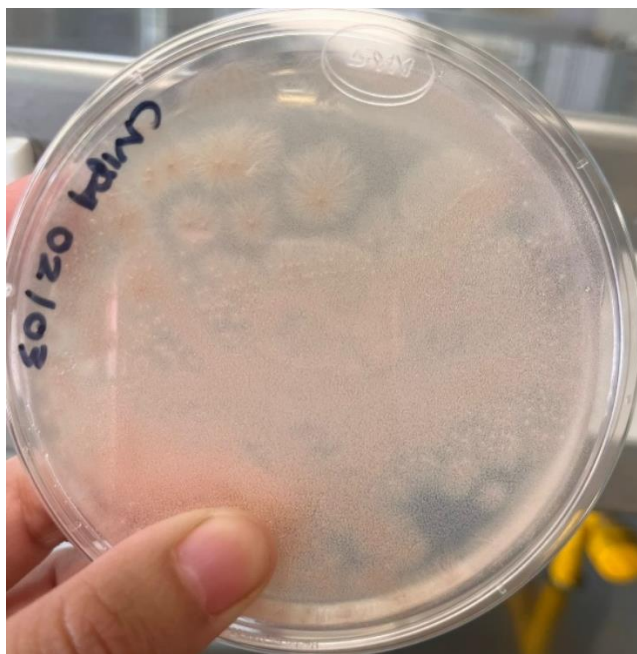


Figura 5. Cultivo primario de la reactivación del aislado fúngico CMP4.

Posteriormente, al resembrar por picadura e incubar por 1 semana, se obtuvieron colonias de color rosa claro con crecimiento radial, de borde filiforme como se aprecia en la figura 5A, mientras que, si se observa el anverso de la caja como en la figura 6B, se observa el crecimiento del micelio filamentoso que penetra el agar con una disminución de la intensidad del color desde el centro a la orilla de la caja Petri. Se realizó un corte del agar, se tiñó con azul de lactofenol y se observó en el microscopio a 10x, y se apreciaron las hifas septadas (figura 6C).

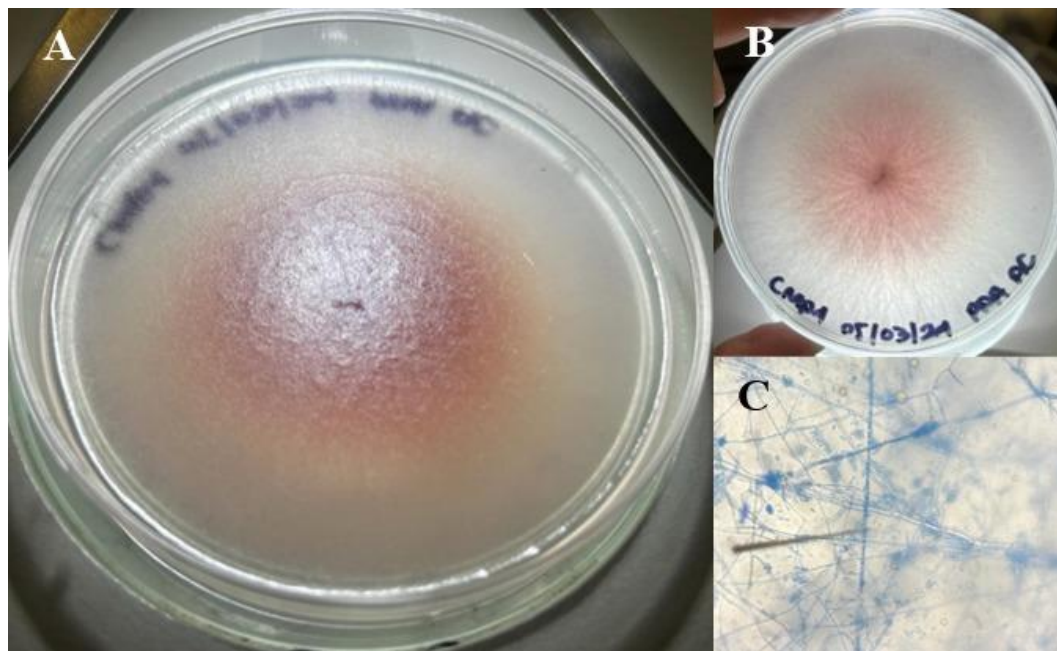


Figura 6. Morfología macroscópica del aislado fúngico CMP4 a una semana de incubación. (A) Anverso de la caja de agar PDA con siembra por picadura del aislado de CMP4. (B) Reverso de la caja del mismo cultivo donde se observa el crecimiento radial filiforme traslúcido. (C) Observación de un cuadro de agar del mismo cultivo al microscopio en 10x con azul de lactofenol.

Con el transcurso del tiempo de incubación, se observó un aumento en la opacidad de las colonias, así como un cambio progresivo en la coloración de la cepa. Inicialmente, se presentó un tono blanquecino, que evolucionó hacia un matiz rosado claro en los primeros días, seguido de tonalidades rojizas y, finalmente, una tonalidad de morado borgoña como se observa en la figura 7A, el crecimiento radial, con micelio color blanquecino de textura algodonosa, al observarlo en el estereoscopio como se aprecia en el figura 7B se apreciaron algunas gotas de agua producto de la condensación atrapadas en el micelio y finalmente se observó al microscopio un cuadro de agar del mismo en 10x sin teñir y se observó el micelio con agrupaciones de esporas como se muestra en figura 7C.

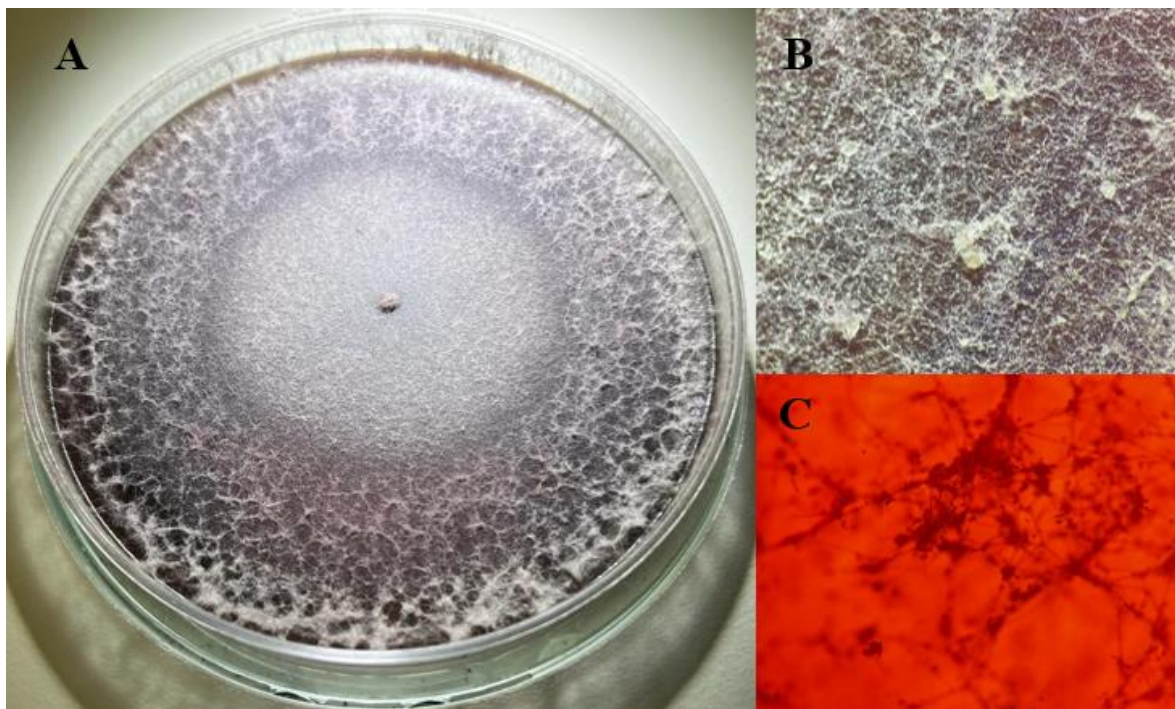


Figura 7. (A) Cultivo del aislado de CMP4 en PDA de tres semanas, con crecimiento radial y formación de micelio en la superficie. Observación macroscópica. (B) Observación del micelio del mismo cultivo en estereoscopio (En metodología yo no encontré descripción de estereoscopio. ¿Esto es parte de un microscopio?). (C) Observación del micelio en de un cuadro de agar del mismo cultivo al microscopio en 10x.

Posteriormente se realizó una observación al microscopio con una preparación al fresco tiñéndola con azul de lactofenol y se observó la pared celular de las hifas traslúcidas, mientras que el interior de los septos se tiñó más intensamente, también se observan algunas ramificaciones de estas y agrupaciones de conidios tal como se observa en la figura 8, la cual fue medida en el programa Image J, y se usó la cuña (0.06 mm) para medir las esporas y las hifas. Las esporas midieron entre 3 y 10 micras, mientras que las hifas midieron 2 micras de grosor y entre 4 y 31 micras de largo entre septo y septo.

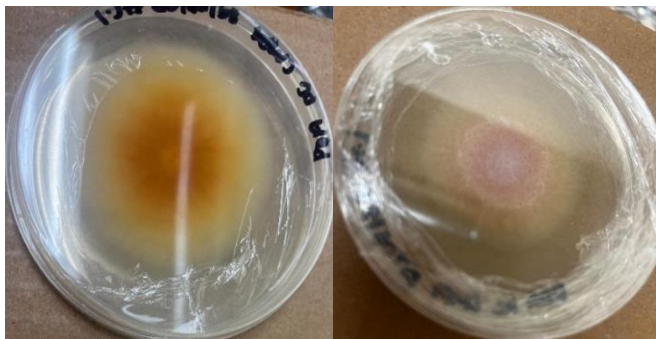


Figura 8. Observación al microscopio de un cultivo de 3 semanas del aislado de CMP4 en un objetivo 40x. se pueden observar las hifas septadas, la pared celular, y los conidios teñidos con azul de lactofenol.

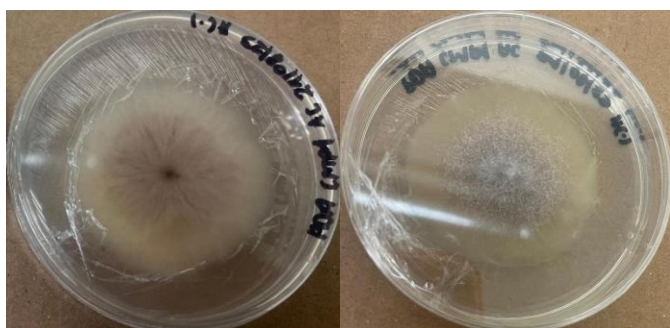
A partir de ese cultivo, se realizó una resiembra en el mismo tipo de medio y se obtuvieron colonias con diferente morfología macroscópica, aunque todas las cajas con cultivo se encontraran en las mismas condiciones, a lo que se procedió a utilizar para el siguiente paso del protocolo aquellas cajas que mostraran una coloración morada para mayor estandarización. A continuación, se muestra en la tabla 6 la descripción de dichos hallazgos.

Tabla 6. Descripción de la diferencia morfológica macroscópica obtenida del aislado fúngico de CMP4 a las mismas condiciones ambientales.

Imagen del aislado CMP4 crecido en PDA	Descripción morfológica
	Colonia de crecimiento radial con una elevación central en el punto del inóculo por picadura, con formación de micelio filiforme que penetra el sustrato de color morado pardo, y micelio sobre la superficie de color blanquecino algodonoso.



Colonia de crecimiento radial, sin elevaciones, con micelio filiforme penetrando el sustrato, mostrando color naranja en el centro y alrededor de color menos intenso progresivamente a amarillo y posteriormente un degradado a color crema en las orillas, en la superficie se observó crecimiento de micelio algodonoso blanquecino sobre la parte de color naranja.



Colonia de crecimiento radial de color blanquecino a grisáceo, con una ligera elevación en el centro, se observa el micelio que penetra el sustrato filiforme de color morado con blanco y posteriormente progresa a color blanco grisáceo en las orillas, con micelio en la superficie sobre la parte de coloración morado-grisáceo.

Además, se llevó a cabo un cultivo microscópico teñido con azul de lactofenol, como se muestra en la figura 9, donde se aprecia en la figura 9A, la imagen del micro cultivo a partir del cual se obtuvieron las micrografías que se muestran en esta sección, el cual fue preparado con un cuadro de PDA inoculado por picadura por el aislado original conservado en glicerol, entre un portaobjetos y un cubreobjetos al cual se le añadió azul de lactofenol al pasar 5 días de crecimiento, los cuales fueron contenidos en una caja Petri con un algodón humedecido. Mientras que, en la figura 9B se observa una micrografía de

este a 10x donde se puede apreciar la distribución de las hifas y sus ramificaciones, así como algunas agrupaciones de esporas.

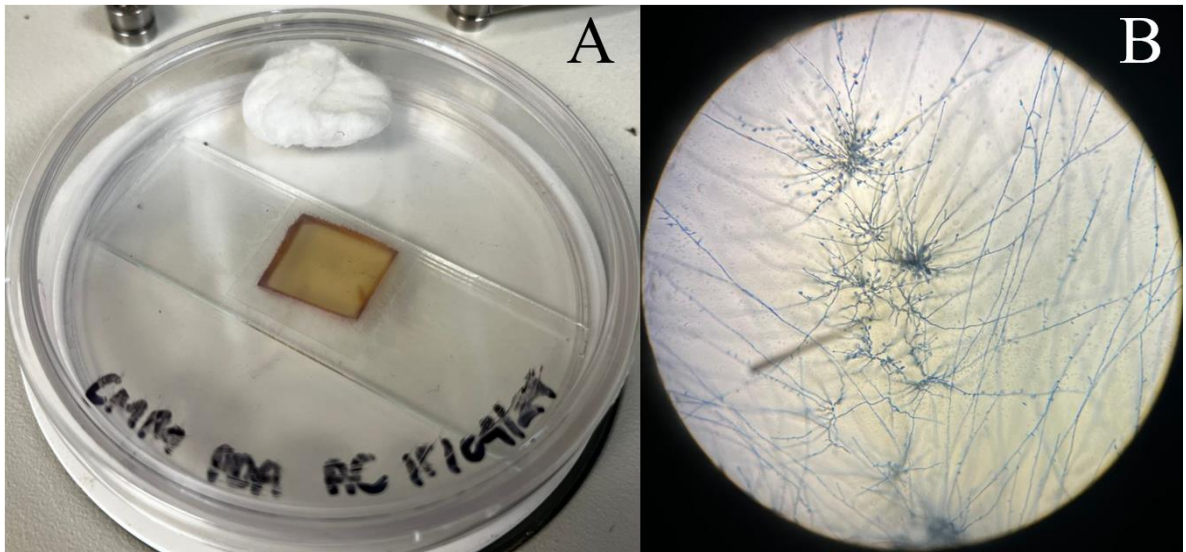


Figura 9. Micro cultivo del aislado CMP4 en un cuadro de agar de PDA, y una micrografía de este a 10x teñido con azul de lactofenol.

El micro cultivo mencionado fue observado bajo el microscopio en fresco a 40x para estudiar los cuerpos fructíferos. Las imágenes obtenidas se presentan en la figura 10, donde se pueden apreciar las diferentes estructuras del aislado. Con el fin de facilitar su apreciación, se realizó una ampliación de la imagen en la región marcada con un recuadro rojo, correspondiente a su versión ampliada, la cual se sitúa en la parte inferior de cada figura correspondiente. En la figura 10A, se observa un campo con numerosas hifas septadas y algunas esporas de forma característica de medialuna con septos en su interior.

En el panel B, se muestra el esporodioquio o cuerpo fructífero del hongo, encerrado tanto en la parte superior como en la inferior, del cual se desprenden algunas esporas.

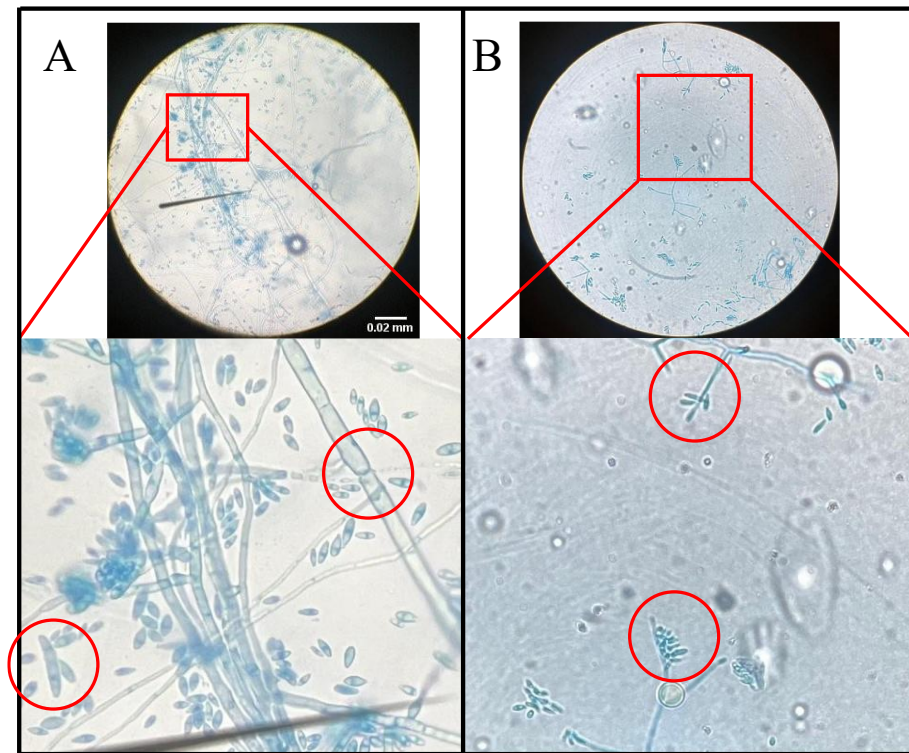


Figura 10. Micro cultivo del aislado fúngico teñido con azul de lactofenol y visto en microscopio óptico a 40x. Se destacan los septos en las hifas, las macroconidias de forma de medialuna característica para el género *Fusarium* (A) y los cuerpos fructíferos de los cuales se desprenden los conidios (B).

7.2 Identificación del aislado de CMP4 por técnicas moleculares

7.2.1 Amplificación de la región ITS

Se amplificó la región ITS del aislado fúngico CMP4 y se comprobó el producto de la PCR en un gel de agarosa al 1% como se muestra en la figura 11, donde se observa en el primer carril el marcador de pares de bases, en el segundo la muestra de ADN purificada y en el tercer carril el control negativo (agua), así mismo, se observa que el fragmento amplificado tiene un peso molecular de aproximadamente entre 500 y 600 pares de bases.

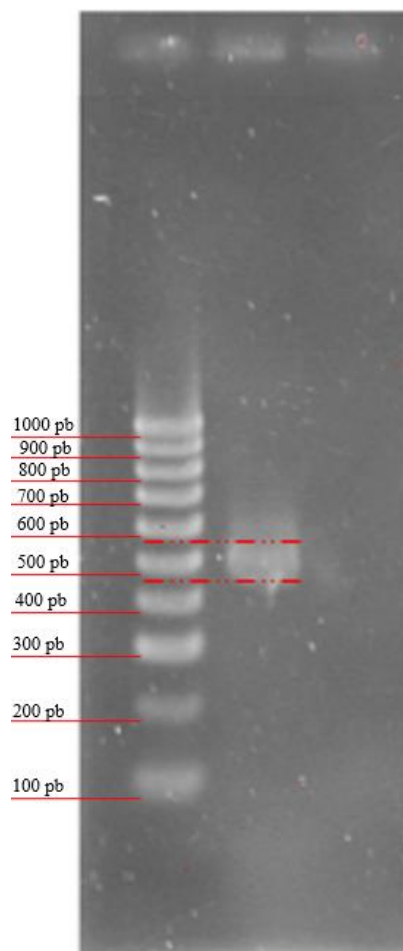


Figura 11. Gel de agarosa al 1 % de la amplificación de una muestra de ADN del aislado fúngico de CMP4, se observa en el primer carril el marcador de pares de bases desde 1,000 pb hasta 100 pb; en el segundo carril la muestra de ADN purificada amplificada en un rango entre 500 y 600 pb y en el tercer carril se cargó el control negativo (agua) sin amplificar.

7.2.2 Secuenciación de regiones de ITS

El producto de PCR cercano al tamaño esperado para la región ITS, purificado, fue enviado a secuenciar. En la figura 11 se muestra el electroferograma de la secuencia obtenida, la cual fue comparada con secuencias que estuvieran presentes en la base de datos GenBank, siendo seleccionadas aquellas secuencias que presentaran el mayor porcentaje de identidad y cobertura. En la Tabla 7 se muestra el género y especie, así como el porcentaje de cobertura del alineamiento de la secuencia y el porcentaje de identidad con el que coincide con la secuencia con la comparada en el GenBank y sus ligas de acceso el cual corresponde a *Fussarium verticillioides* y en la tabla 8 se encuentra su clasificación taxonómica.

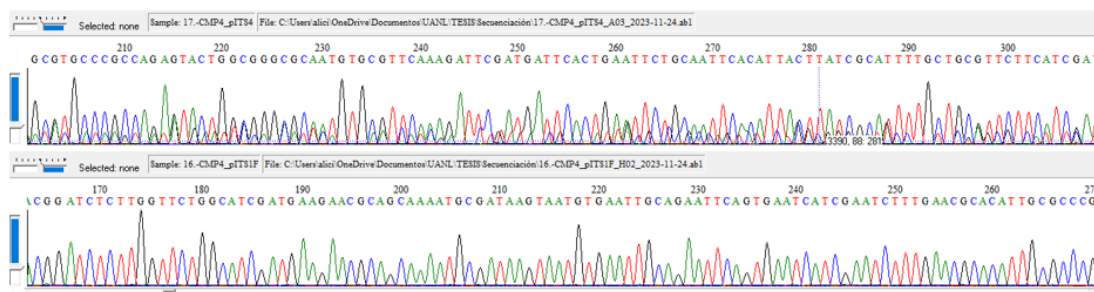


Figura 12. Electroferograma de la secuenciación de Sanger del aislado de CMP4 de la amplificación del fragmento ITS con los cebadores ITS1F e ITS4.

Tabla 7. Resultados de la comparación de la secuencia obtenida del aislado en GenBank.

Nombre	% QC	%ID	Ligas de acceso
<i>Fusarium verticillioides</i>	99%	99.78%	MN871798.1
	99%	99.78%	KY426418.1
	99%	99.78%	OR975836.1
	99%	99.78%	OR884160.1
	99%	99.78%	KT587649.1

%QC: Porcentaje de la cobertura del alineamiento de la secuencia. %ID: Porcentaje de identidad.

Tabla 8. Clasificación taxonómica de *Fusarium verticillioides*.

Categoría	Descripción
Reino	<i>Fungi</i>
Subreino	<i>Dikarya</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Subfilo	<i>Pezizomycotina</i>
Clase	<i>Sordariomycetes</i>
Subclase	<i>Hypocreomycetidae</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>
Familia	<i>Nectriaceae</i>
Genero	<i>Fusarium</i>
Especie	<i>Verticillioides</i>

7.3 Tratamiento del aislado fúngico de CMP4 con nanopartículas de plata (“BioArgovit®”)

7.3.1 Peso fresco después de los tratamientos del aislado fúngico CMP4 con AgNPs

Durante un periodo de 15 días, se registró el peso fresco de los tubos que contenían un aislado fúngico tratado con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata BioArgovit®. Los tratamientos consistieron en una solución de 10 mM (tratamiento A), 1 mM (tratamiento B), 100 μ M (tratamiento C), y 10 μ M (tratamiento D) de nanopartículas respectivamente. Se incluyeron controles negativos: un tratamiento (E) con una solución de PDB estéril y otro (F) con agua estéril, ambos con un gramo adicional de biomasa.

La figura 13 presenta imágenes como evidencia de este procedimiento para completar esta fase del experimento. En la figura 13A se muestran los diferentes tubos utilizados al ser inoculados con el micelio del aislado CMP4, donde se observa la diferencia de volumen entre los tratamientos A, B, C, y D, y los tratamientos E y F, ya que las nanopartículas de plata aún no se habían vaciado en el momento de tomar la fotografía. En la figura 13B se muestra la dilución seriada de las nanopartículas de plata, evidenciando el gradiente de color que indica la disminución en la concentración. Finalmente, en la figura 13C se ilustra cómo se tomó el peso fresco de los tubos diariamente, los cuales estaban recubiertos de aluminio. El peso del aluminio se registró antes de recubrir los tubos, para que la diferencia

de peso pudiera ser descontada y no afectara los resultados del peso fresco analizado en el experimento.

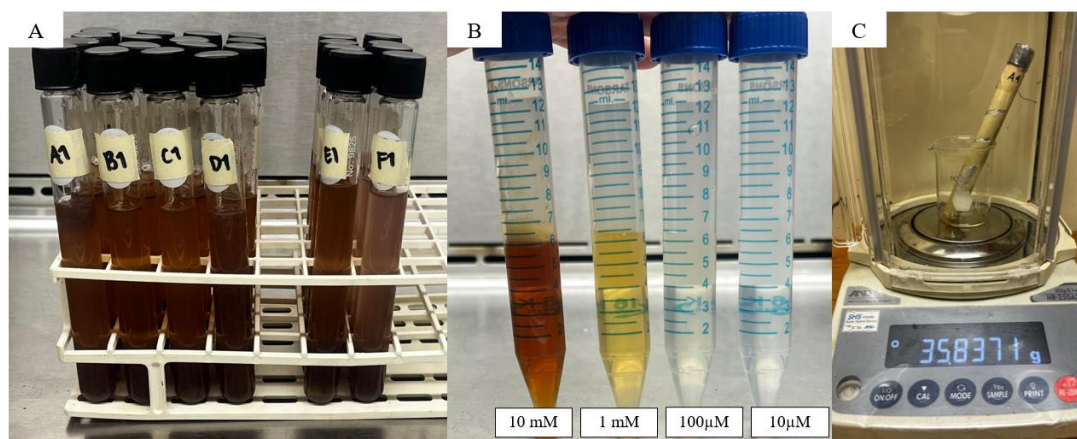


Figura 13. Evidencia del tratamiento del aislado fúngico con nanopartículas de plata. En el panel A se observan los tubos rotulados de acuerdo con su respectiva solución tratada y número de repetición antes de agregarles las nanopartículas de plata. En el panel B se observan las diluciones seriadas de AgNPs antes de colocarlas en sus respectivos tubos y en el panel C, se observa un tubo con su cubierta de aluminio para impedir el paso de la luz al tubo y evitar la oxidación.

Al finalizar el período de tratamiento, los tubos se observaron como se muestra en la figura 14, donde se aprecia un cambio de coloración de rosa a marrón, en los tubos con solución de biomasa tratada a diferencia de los tubos sin tratamiento de AgNPs.



Figura 14. Tubos con el aislado fúngico tratado con AgNPs después de 15 días de agitación. En el panel 1 se muestra el tratamiento A, correspondiente a una concentración de AgNPs de 10 mM; en el panel 2, el tratamiento B (1 mM); en el panel 3, el tratamiento C (100 μ M); en el panel 4, el tratamiento D (10 μ M); en el panel 5, el tratamiento E de la biomasa en PDA; y en el panel 6, el tratamiento del aislado en agua destilada estéril.

De los datos obtenidos por su peso fresco, se generó el gráfico presentado en la figura 15. Se observó que el tratamiento B (1 mM) mantuvo su peso de manera más constante en comparación con los otros tratamientos, mostrando una diferencia significativa con un intervalo de confianza del 95%. El tratamiento C (100 μ M) mostró una disminución lineal en el peso fresco, mientras que los tratamientos A y D (10 mM y 10 μ M respectivamente) mostraron un comportamiento similar: una disminución en los días 6 y 8, seguida de un aumento de masa en el día 11 y una estabilización hasta el día 15.

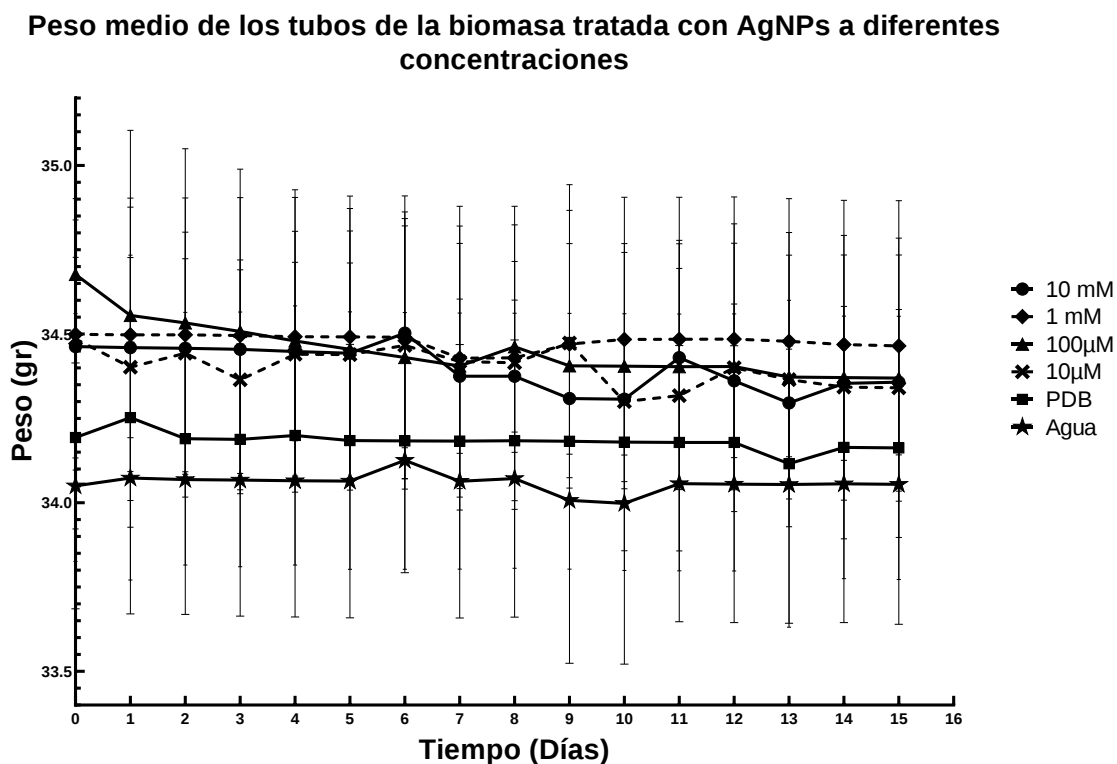


Figura 15. Peso medio de los tubos con solución de biomasa tratada con AgNPs a diferentes concentraciones obtenido en gramos y sus controles durante los 15 días del experimento.

7.3.2 Viabilidad por resiembra y conteo de esporas por cada tratamiento

Después de los 15 días de tratamiento en agitación con nanopartículas, la biomasa fresca fue filtrada y transferida a microtubos cónicos. Luego, se realizó una re-inoculación por picadura en PDA para confirmar la viabilidad después del tratamiento con AgNPs, las imágenes correspondientes a la re-inoculación se presentan en la figura 16, mostrando el

crecimiento del aislado en diferentes tratamientos después de 7 días de incubación a temperatura ambiente, se puede distinguir que los tratamientos A B y D presentan una coloración más intensa que los tratamientos B, C y F.

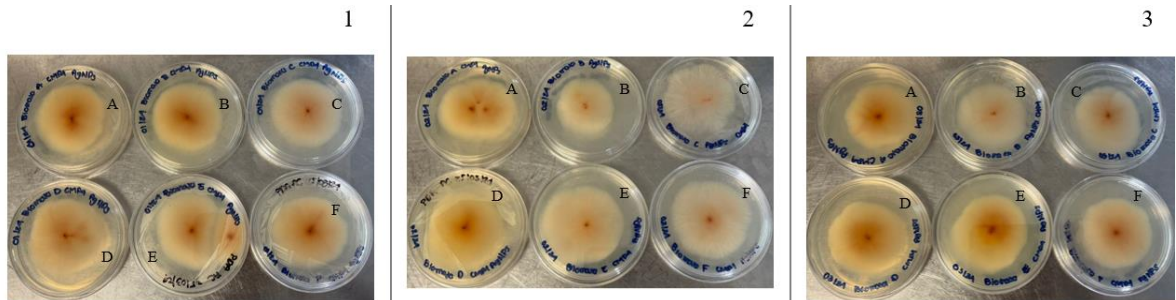


Figura 16. Re-inóculo de la biomasa tratada con AgNPs en PDA, por picadura para revisión de viabilidad. En el panel A, se encuentran los diferentes tratamientos (Tratamiento A, B y C en la parte superior y D, E y F en la parte inferior de cada panel respectivamente).

Posteriormente se realizó un conteo de esporas en cámara de Neubauer, como se ilustra en la figura 17. En el panel izquierdo superior se muestra una imagen del conteo de un cuadrante en la cámara de una muestra de biomasa del tratamiento C, mientras en el panel superior derecho se observa un cuadrante de un conteo de biomasa del tratamiento E, en la parte inferior se observa una ampliación de dichos cuadrantes para la apreciación de las esporas teñidas con azul de lactofenol en un microscopio óptico en 40x.

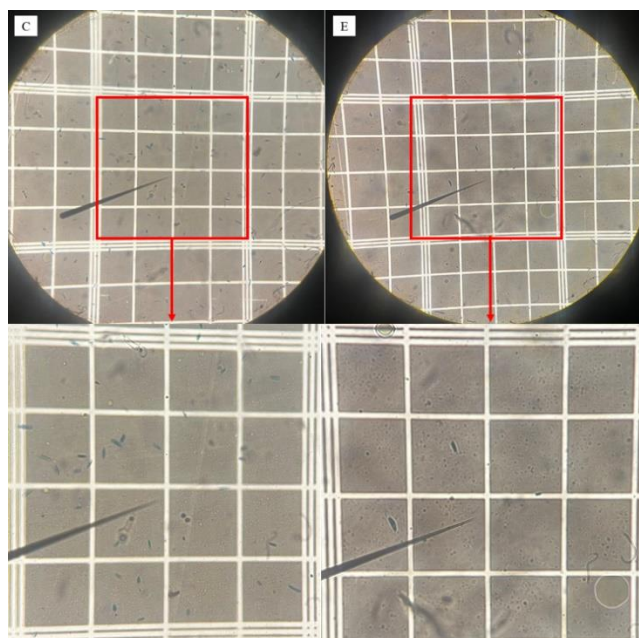


Figura 17. Conteo de esporas teñidas con azul de lactofenol a 40x en cámara de Neubauer. Se observa en los paneles los cuadrantes correspondientes a una muestra del tratamiento C y E respectivamente con su ampliación.

En la figura 18 se muestra el gráfico de las medias del conteo de esporas en cámara de Neubauer para cada tratamiento. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, con un intervalo de confianza del 95%. Sin embargo, el tratamiento C (100 μ M) mostró un conteo de esporas mayor, con 7×10^7 esporas por cada 100 mg de biomasa filtrada, en comparación con los otros tratamientos con nanopartículas, que obtuvieron

una cantidad de esporas de 7×10^6 por 100 mg de biomasa. En contraste, los controles presentaron una esporulación menor, con 6×10^6 esporas por cada 100 mg de biomasa.

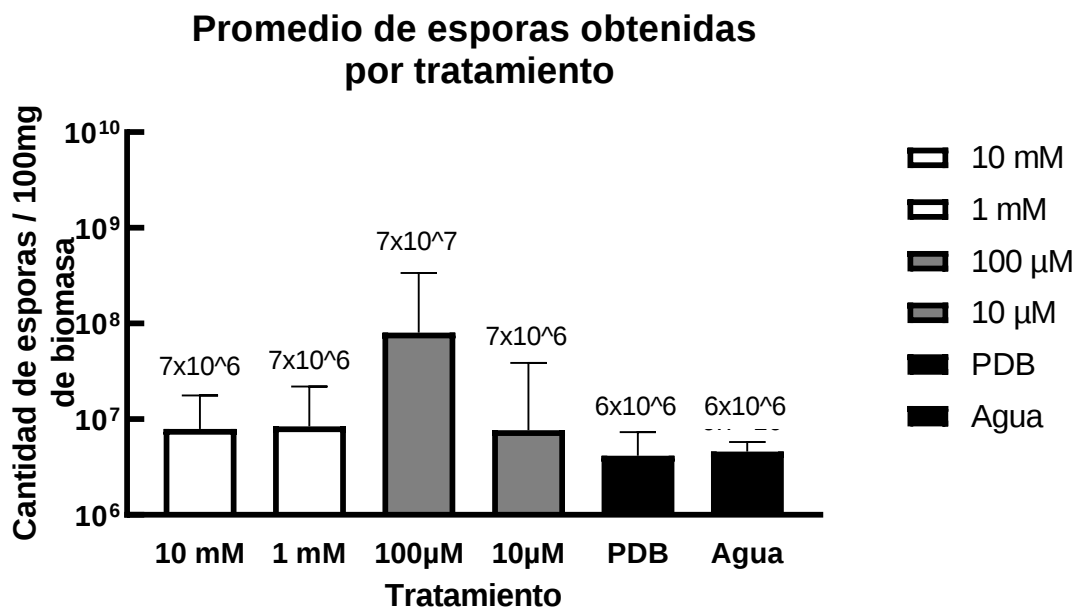


Figura 18. Cantidad media de esporas obtenida en los diferentes tratamientos en 100 mg de biomasa filtrada en sus respectivos tratamientos.

7.4 Tratamiento de las semillas de maíz con el aislado fúngico tratado con AgNPs

7.4.1 Determinación del vigor del lote de semillas utilizadas en el experimento

Para conocer la cantidad de semillas que germinan de el mismo lote utilizado en el experimento, se realizó una prueba en la que las semillas se colocaron a germinar sin tratarlas con hongo ni con nanopartículas de plata, de la forma en que se ilustra en la figura 19 como evidencia de este paso durante el experimento, se observa como de algunas semillas emerge una pequeña plántula.

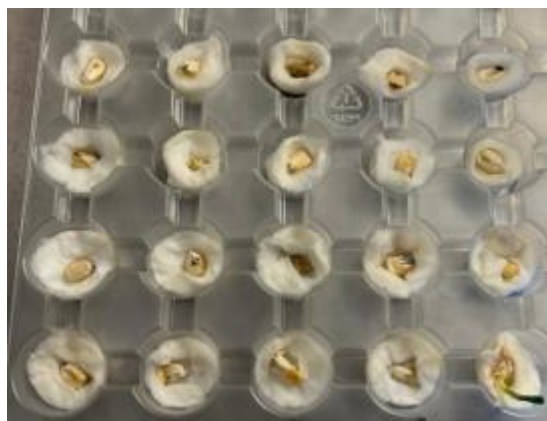


Figura 19. Germinación de las semillas de maíz Chalqueño como prueba de vigor del lote utilizado en este experimento al 5 día.

Al finalizar el experimento se obtuvo un porcentaje de germinación de aproximadamente el 40% de las 15 plantas por triplicado, estos datos se muestran en la figura 20. Estos resultados se tomaron como el control negativo para los experimentos de germinación de las semillas recubiertas del aislado fúngico tratado con nanopartículas de plata.

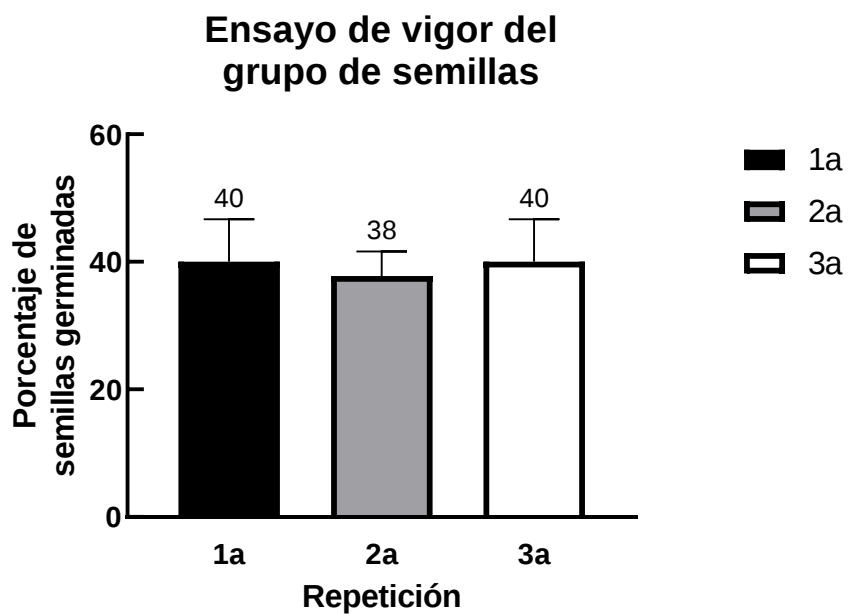


Figura 20. Porcentaje de semillas germinadas del grupo utilizado en el presente experimento, por cada repetición (1ª, 2ª y 3ª).

7.4.2 Ensayos de fito patogenicidad del aislado fúngico de CMP4 en plantas de maíz (in planta)

Debido a los resultados obtenidos mediante técnicas moleculares, donde se identificó que el aislado fúngico utilizado es *Fusarium verticillioides*, conocido como un patógeno principal, se llevó a cabo una prueba de patogenicidad. En esta prueba, se utilizaron plántulas de maíz de 3 semanas de edad, sin ningún tratamiento adicional (grupo control), obtenidas del experimento de germinación. Se preparó una solución de 10 ml de gelatina al 15%, inoculada con el aislado fúngico sin tratamiento a una concentración de 1×10^6 esporas por mL, y se aplicó por el envés de las hojas, en la figura 21 se muestra evidencia de este ensayo.

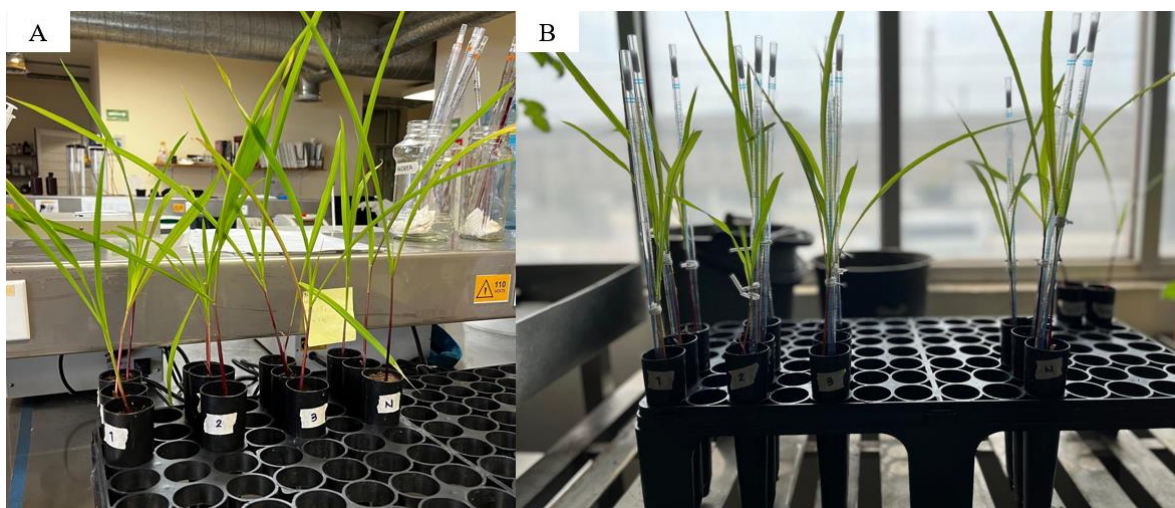


Figura 21. Prueba de patogenicidad en plántulas de maíz Chalqueño utilizando del aislado fúngico de CMP4 (*Fusarium verticillioides*). En el Panel A se observan las plántulas al día 0 de la inoculación y en el panel B, se observan las plántulas al día 14. Se observan las etiquetas 1,2,3 indicando la repetición a la que pertenecen y la letra N como control negativo (no inoculado).

Los efectos en las plántulas fueron observados durante un período de 14 días, y al finalizar no se observaron diferencias entre el grupo control y el grupo inoculado, los cuatro grupos mostraron clorosis en las hojas. Sin embargo, pudo haber sido por la temperatura registrada durante los días del ensayo.

7.4.3 Determinación del porcentaje de germinación de semillas tratadas con biomasa con AgNPs

Se recubrieron las semillas de maíz Chalqueño con biomasa tratada con AgNPs y biomasa sin tratamiento, tal como se ilustra en la figura 22A , se aprecian tubos cónicos de 15 ml

que contienen la biomasa filtrada y estandarizada a un conteo de esporas de 1×10^6 mezclada con metilcelulosa, en los cuales se sumergieron por 5 segundos las semillas una por una con pinzas estériles y fueron colocadas en cajas Petri para secarse como se muestra en la figura 22B.

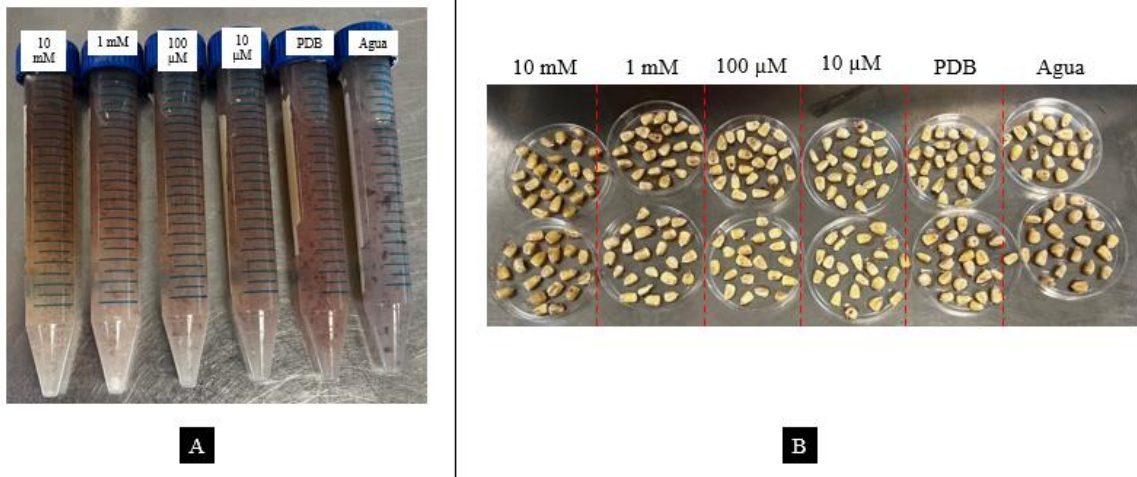


Figura 22. Evidencia del recubrimiento de las semillas con biomasa tratada con AgNPs. Panel A: Muestras de biomasa tratada en metilcelulosa. Panel B: Semillas de maíz Chalqueño recubiertas con biomasa tratada. Cada una etiquetada con su respectivo tratamiento.

Después de sembrar las semillas con recubrimiento de biomasa tratada con AgNPs, se regaron las plantas cuando requerían agua y se contaron las plántulas germinadas durante los 15 días del experimento, y se calculó el porcentaje de germinación, los cuales se esquematizan en la figura 23, donde se observa el mayor crecimiento en los tratamientos A y D, seguido del tratamiento B y el tratamiento C, los cuales presentaron un mayor porcentaje de germinación que los controles con el hongo, pero con menor porcentaje de germinación que las semillas sin tratamiento.

Porcentaje de germinación de maíz Chalqueño tratado con biomasa con AgNPs

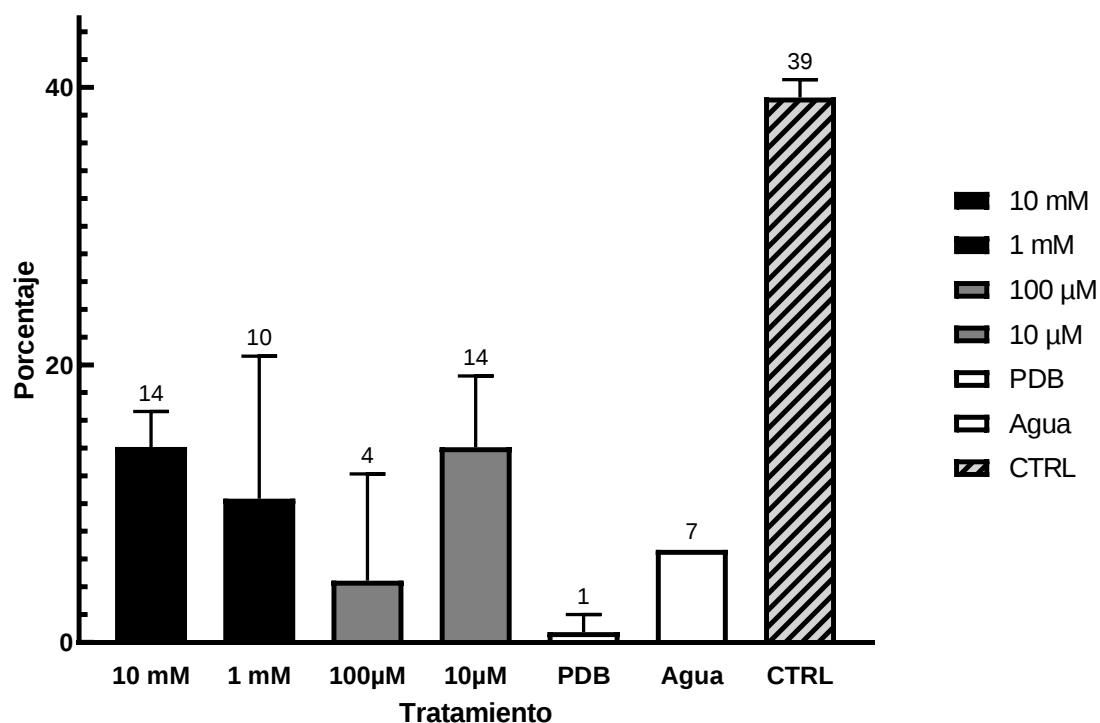


Figura 23. Porcentaje de germinación después de los diferentes tratamientos y el control de semillas sin tratamiento (CTRL (-)).

Así mismo se midieron los diferentes tejidos de las plantas y se obtuvo el gráfico representado en la figura 24. Se observó una disminución en la longitud de las raíces en los tratamientos tratados con aislado fúngico, sobre todo aquel crecido en cultivo PDB estéril a comparación con las plántulas sin tratamiento.

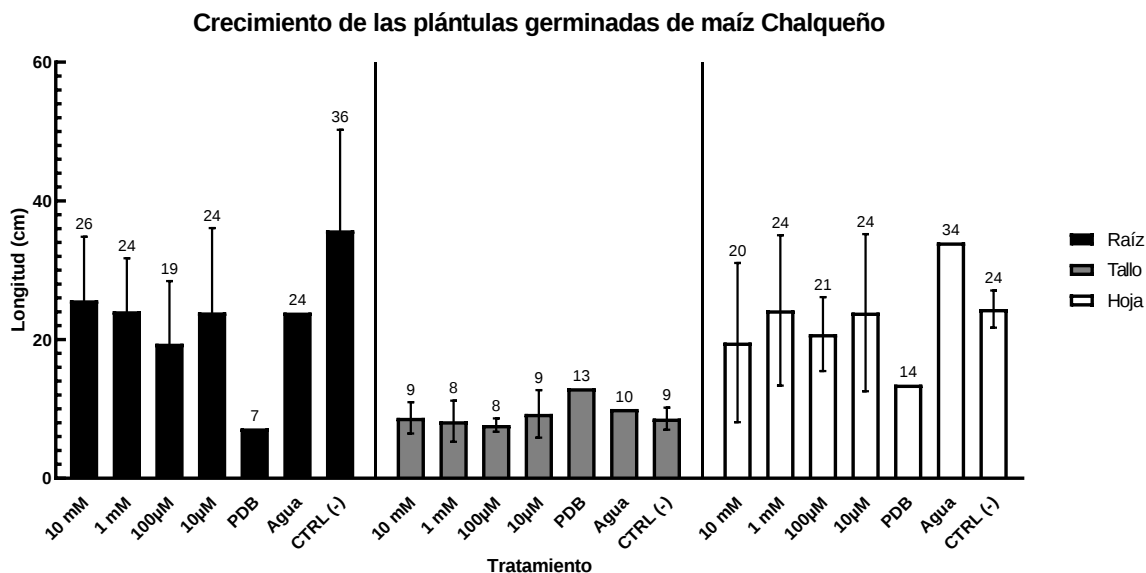


Figura 24. Longitud de la raíz, tallo y hoja de las semillas germinadas en los diferentes tratamientos de aislado fúngico con y sin AgNPs, y el control negativo de plántulas sin tratamiento en centímetros al finalizar los 60 días del experimento.

7.5 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se realizó como se detalla a continuación dividido en partes por cada objetivo y posteriormente se presenta un panorama global para concluir.

7.5.1 Tratamiento del aislado fúngico de CMP4 con nanopartículas de plata (“BioArgovit®”)

Para esta sección, se formuló la hipótesis nula como: no existe diferencia significativa en el efecto entre las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata sobre el crecimiento del aislado fúngico ($p \leq 0.05$). Para este análisis se tuvo en cuenta las variables cuantitativas independientes que fueron los tratamientos (las diferentes concentraciones de AgNPs y sus controles) y las variables cuantitativas dependientes, que fueron los pesos tomados diariamente.

Para el análisis primero se comprobó la normalidad de los datos obtenidos, en la tabla 10 se muestra el resumen del procesamiento, seguido de la prueba de normalidad en la tabla 11 y la estadística descriptiva en la tabla 12. Para este caso, como el número de muestras es menor a 50, se usa la prueba de Shaphiro-Wilk. Para la cual la H_0 indica que, si el valor de significancia es mayor que alfa, los datos tienen una distribución normal, y la H_a indica

que, si el valor de significancia es menor que alfa, los datos no siguen una distribución normal.

Tabla 9. Resumen del procesamiento de los casos del peso fresco de los tubos con biomasa.

Resumen del procesamiento de los casos						
	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
10 mM	16	100.0%	0	0.0%	16	100.0%
1 mM	16	100.0%	0	0.0%	16	100.0%
100μM	16	100.0%	0	0.0%	16	100.0%
10μM	16	100.0%	0	0.0%	16	100.0%
Agua	16	100.0%	0	0.0%	16	100.0%
PDB	16	100.0%	0	0.0%	16	100.0%

Tabla 10. Prueba de normalidad para los pesos de los diferentes tratamientos a los que se sometió el aislado fúngico

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
10 mM	.192	16	.117	.883	16	.053
1 mM	.207	16	.065	.826	16	.060
100μM	.092	16	.200*	.952	16	.518
10μM	.155	16	.200*	.905	16	.097
Agua	.131	16	.200*	.978	16	.947
PDB	.163	16	.200*	.952	16	.526

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 11. Estadístico descriptivo de los tratamientos a los que fue sometida la biomasa

Estadísticos descriptivos									
	N	Mínimo	Máximo	Media		Desv. típ.	Varianza	Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error típico
10 mM	16	34.31	34.46	34.3927	.01398	.05594	.003	-1.542	1.091
1 mM	16	34.45	34.50	34.4864	.00310	.01241	.000	2.698	1.091
100µM	16	34.28	34.57	34.4416	.02389	.09556	.009	-1.019	1.091
10µM	16	34.28	34.49	34.3643	.01124	.04495	.002	2.785	1.091
Agua	16	34.16	34.20	34.1822	.00226	.00903	.000	.647	1.091
PDB	16	34.05	34.07	34.0627	.00172	.00689	.000	-.951	1.091
N	16								

Como las variables sí reportaron normalidad, y por la naturaleza de las variables, se realizó una prueba de ANOVA de un factor, y los resultados arrojados se reportan en la tabla 13, como hubo significancia menor a 0.05 se rechazó la hipótesis nula y se realizó una prueba de Tukey, los resultados de esta prueba se muestran en la tabla 14, en la cual los resultados indican que existe diferencia significativa entre la concentración 1mM y el resto de los tratamientos.

Tabla 12. ANOVA de un factor del peso fresco del aislado fúngico CMP4 en sus diferentes tratamientos.

ANOVA de un factor						
Pesos						
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	
Inter-grupos	2.158	5	.432	177.788	4.6556E-45	
Intra-grupos	.218	90	.002			
Total	2.376	95				

Tabla 13. Prueba de Tukey del peso fresco del aislado fúngico CMP4 en sus diferentes tratamientos.

Pesos						
HSD de Tukey						
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5

Agua	16	34.062731				
PDB	16		34.182231			
10µM	16			34.364275		
10 mM	16			34.392656	34.392656	
100µM	16				34.441650	34.441650
1 mM	16					34.486363
Sig.		1.000	1.000	.582	.065	.116

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 16.000.

7.5.2 Tratamiento de las semillas de maíz con el aislado fúngico tratado con AgNPs

Para esta sección, se formuló la hipótesis nula como: no existe diferencia significativa en el efecto entre las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata sobre el porcentaje de germinación y tamaño de plántula de maíz Chalqueño ($p \leq 0.05$). Donde se tuvieron las variables cuantitativas, dependientes fueron los porcentajes de germinación y las variables cuantitativas e independientes que fueron los diferentes tratamientos a los que se sometieron las semillas.

Como en la sección anterior, primero se realizó la prueba de normalidad, en la tabla 15 se muestra el resumen del procesamiento, seguido de la estadística descriptiva en la tabla 16 y la prueba de normalidad en la tabla 17. Para este caso, como el número de muestras es menor a 50 ($n=9$), se usa la prueba de Shapiro-Wilk. Para la cual la H_0 indica que, si el valor de significancia es mayor que alfa, los datos tienen una distribución normal, y la H_a indica que, si el valor de significancia es menor que alfa, los datos no siguen una distribución normal.

Tabla 14. Procesamiento de los datos de germinación de semillas tratadas con nanopartículas de plata en la biomasa del aislado fúngico.

Resumen del procesamiento de los casos						
	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
10 mM	9	100.0%	0	0.0%	9	100.0%
1 mM	9	100.0%	0	0.0%	9	100.0%

100μM	9	100.0%	0	0.0%	9	100.0%
10μM	9	100.0%	0	0.0%	9	100.0%
Agua	9	100.0%	0	0.0%	9	100.0%
PDB	9	100.0%	0	0.0%	9	100.0%
CTRL	9	100.0%	0	0.0%	9	100.0%

Tabla 15. Estadística descriptiva de los datos de porcentaje de germinación de las semillas en sus diferentes tratamientos.

Estadísticos descriptivos													
	N	Rango	Mín	Máx	Suma	Media		Desv. típ.	Varianza	Asimetría		Curtosis	
	E	E	E	E	E	E	ET	E	E	E	ET	E	ET
10 mM	9	27	0	27	127	14.07	3.032	9.095	82.721	.128	.717	-.782	1.4
1 mM	9	27	0	27	93	10.37	3.354	10.061	101.228	.986	.717	-.259	1.4
100μM	9	27	0	27	40	4.44	2.940	8.819	77.778	2.453	.717	6.332	1.4
10μM	9	20	0	20	120	13.33	2.722	8.165	66.667	-1.050	.717	-.286	1.4
Agua	9	7	0	7	7	.74	.741	2.222	4.938	3.000	.717	9.000	1.4
PDB	9	13	0	13	60	6.67	1.111	3.333	11.106	-.002	.717	4.000	1.4
CTRL	9	13	33	47	353	39.26	1.738	5.213	27.172	.216	.717	-1.041	1.4
N	9												

- * N válido (según lista). Min= Mínimo, Max= Máximo E= Estadístico, ET= Error Típico

Tabla 16. Prueba de normalidad para los porcentajes de germinación de las semillas tratadas con nanopartículas de plata en la biomasa.

Pruebas de normalidad	
Kolmogorov-Smirnov ^a	Shapiro-Wilk

	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
10 mM	.199	9	.200*	.931	9	.495
1 mM	.310	9	.013	.813	9	.029
100μM	.360	9	.001	.591	9	.000
10μM	.278	9	.044	.766	9	.008
Agua	.519	9	.000	.390	9	.000
PDB	.389	9	.000	.693	9	.001
CTRL	.223	9	.200*	.838	9	.055

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Como las variables no reportaron suficiente normalidad, y por la naturaleza de las variables, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. A continuación, se muestran en la tabla 18 los rangos para la prueba y en la tabla 19 los estadísticos de contraste de esta prueba y finalmente en la tabla 20 el resumen de prueba de hipótesis.

Tabla 17. Rangos de los tratamientos en el experimento de germinación de semillas de maíz tratados con nanopartículas en la biomasa.

Rangos			
	TRATAMIENTO	N	Rango promedio
PORCENTAJE	10 mM	9	38.44
	1mM	9	32.00
	100μM	9	18.61
	10μM	9	36.78
	PDB	9	12.28
	Agua	9	26.89
	CTRL	9	59.00
	Total	63	

Tabla 18. Estadísticos de contraste para la prueba de KW en los tratamientos de nanopartículas en biomasa para la germinación de las semillas.

Estadísticos de contraste ^{a,b}	
	PORCENTAJE
Chi-cuadrado	38.743
Gl	6
Sig. asintót.	.000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación:
TRATAMIENTO

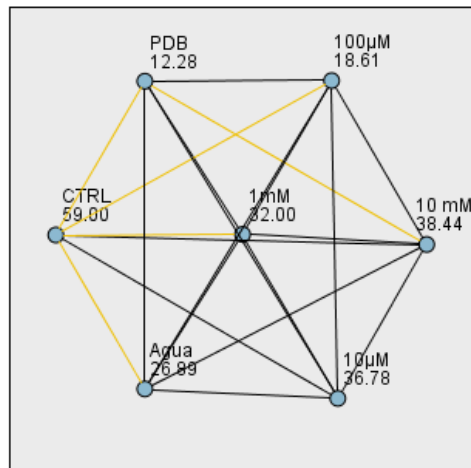
Tabla 19. Resumen de prueba de hipótesis para la germinación de semillas tratadas con nanopartículas en la biomasa.

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de PORCENTAJE es la misma entre las categorías de TRATAMIENTO.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	.000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

Como hubo diferencia significativa entre los tratamientos, se rechaza la hipótesis nula, por lo que hay diferencia significativa entre al menos uno de los tratamientos, para analizar cuál de ellos se realizó la prueba post-hoc correspondiente, la cual es una corrección de Bonferroni. A continuación, se desglosan los resultados de esta prueba, en la figura 25 se observa la correlación entre los tratamientos y en la tabla 21 se destaca en color amarillo los tratamientos que tuvieron diferencia significativa, los cuales fueron 1mM, 100µM, Agua, y PDB con el control y PDB con 10 mM.

Comparaciones por parejas de TRATAMIENTO



Cada nodo muestra el rango de media de muestras de TRATAMIENTO.

Figura 25. Esquema de comparación por parejas de las medias para los diferentes porcentajes de germinación de las semillas sometidas a los diferentes tratamientos

Tabla 20. Comparación de medias por corrección de Bonferroni para el porcentaje de germinación de semillas de maíz tratado con AgNPs en la biomasa.

Muestra1-Muestra2	Prueba estadística	Error típico	Desv. Prueba estadística	Sig.	Sig. ady.
PDB-100µM	6.333	8.464	.748	.454	1.000
PDB-Agua	-14.611	8.464	-1.726	.084	1.000
PDB-1mM	19.722	8.464	2.330	.020	.416
PDB-10µM	24.500	8.464	2.895	.004	.080
PDB-10 mM	26.167	8.464	3.092	.002	.042
PDB-CTRL	-46.722	8.464	-5.520	.000	.000
100µM-Agua	-8.278	8.464	-.978	.328	1.000
100µM-1mM	13.389	8.464	1.582	.114	1.000
100µM-10µM	-18.167	8.464	-2.146	.032	.669
100µM-10 mM	19.833	8.464	2.343	.019	.401
100µM-CTRL	-40.389	8.464	-4.772	.000	.000
Agua-1mM	5.111	8.464	.604	.546	1.000
Agua-10µM	9.889	8.464	1.168	.243	1.000
Agua-10 mM	11.556	8.464	1.365	.172	1.000
Agua-CTRL	-32.111	8.464	-3.794	.000	.003
1mM-10µM	-4.778	8.464	-.564	.572	1.000
1mM-10 mM	6.444	8.464	.761	.446	1.000
1mM-CTRL	-27.000	8.464	-3.190	.001	.030
10µM-10 mM	1.667	8.464	.197	.844	1.000
10µM-CTRL	-22.222	8.464	-2.626	.009	.182
10 mM-CTRL	-20.556	8.464	-2.429	.015	.318

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas.
Se muestran las significancias asintóticas (pruebas de 2 caras). El nivel de significancia es .05.

8 DISCUSIÓN

Actualmente la nanotecnología ha emergido en el campo agrícola, particularmente los nanomateriales como las AgNPs, las cuales han demostrado actuar como mejoradoras de la germinación de semillas, el crecimiento de las plantas, y sirven como nano-pesticidas y fertilizantes (Khan et al. 2023). Se ha reportado que los efectos de las nanopartículas de plata dependen de la concentración, las propiedades fisicoquímicas de estas, y el tipo de organismo al que se aplican (Budhani et al. 2019; Siddiqi y Husen, 2021). Sin embargo, ha sido ampliamente documentado su efecto anti-microbiano contra diversos patógenos como *Candida albicans*, *Aspergillus sp.*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium sp.*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Staphylococcus sp.* y *Bacillus sp.*, así como contra algunos microorganismos resistentes a múltiples fármacos (Wen, et al. 2023).

8.1 Identificación del aislado fúngico CMP4 mediante técnicas moleculares y por morfología micro y macroscópica

En el presente trabajo, se empleó un hongo endófito aislado de maíz el cual fue sometido a diferentes concentraciones de plata con el fin de evaluar aquella que le confiriera mayor viabilidad y a su vez permitiera la mayor germinación de semillas al ser inoculado en maíz nativo de raza Chalqueño. Este aislado fue identificado molecularmente como *Fusarium verticillioides* por amplificación del segmento ITS, secuenciado y comparado en la plataforma de GenBank de acuerdo con los porcentajes de cobertura del alineamiento de la secuencia al 99% y un porcentaje de identidad del 99.7% de las cinco secuencias citadas en la sección de resultados (páginas 30 a 37).

F. verticillioides anteriormente conocido como *Fusarium moniliforme* es un hongo de gran importancia agrícola, ya que es el agente causal primario de enfermedad en maíz en todo el mundo, aunque también está relacionado con otros tipos de cereales (Deepa et al. 2021). Se ha reportado como endófito en maíz de regiones de México y Argentina (Xing et al. 2018) y se ha indicado que como endófito puede mejorar la resistencia de la planta huésped a otros agentes patógenos. Al reducir la severidad de la enfermedad provocada por el patógeno del carbón del maíz, *Ustilago maydis*, en el maíz (Lee et al. 2009), así como la capacidad de favorecer el desarrollo de las plantas en condiciones de estrés solubilizando el fosfato y estimulando

el desarrollo de las plantas en condiciones de estrés por salinidad, lo cual es beneficioso para cultivos como la soja (Radhakrishnan et al. 2014). En una investigación anterior realizada por Ebrahim et al. (2020), se observó que actúa como un estímulo para la síntesis de cumarinas y sesquiterpenoides, los cuales poseen propiedades antifúngicas contra ciertas cepas de *Fusarium sp.* Además, de que también se sugiere que puede habitar en los tejidos del maíz sin manifestar síntomas aparentes. Esta colonización sin síntomas podría otorgar cierta resistencia contra patógenos más agresivos, actuando como una defensa para la planta hospedera, sin embargo, la producción de fumonisinas y la acumulación de estas en el maíz sigue siendo una problemática para el empleo de este hongo (Bryła et al. 2022; Cao et al. 2022).

Por otro lado, la identificación morfológica coincide con los datos ya reportados acerca de este tipo de hongo, crecido en PDA, las colonias exhiben crecimiento de micelio aéreo blanquecino de textura algodonosa a viscosa, y el reverso de la caja se presenta en diferentes colores: blanco, crema, gris, amarillo, rosado y violeta (Tabla 6) , algunos autores reportan que la intensidad de la coloración en colonias de color violeta (figura 6) es adquirido con el tiempo de crecimiento, así mismo se ha descrito que crece rápidamente a una temperatura de 25°C y crece lentamente a 37°C, (Nithiyaa et al. 2012, Pitt, 2014; Deepa N, y Sreenivasa MY.;2017). Otros autores reportan que la pigmentación del aislado puede estar relacionado con la virulencia de este, donde el color violeta es el más virulento, dado que está vinculado con genes que dirigen la síntesis del complejo enzimático conocido como PKS, el cual produce policétidos, fumonisina C y el ácido fusárico. Sin embargo, en estos mismos estudios se describe que no es una regla donde cierta pigmentación sea más virulenta que otra, pues no hay evidencia en los resultados de patogenicidad que lo demuestren (Solano-Báez et al. 2011; Zácamo-Velázquez et al. 2022.)

Dentro de la morfología microscópica se ha encontrado que las colonias producen una mayor cantidad de esporas en la parte aérea del cultivo, dichas esporas se dividen en microconidias de forma ovalada sin septos en su interior que pueden llegar a medir entre 0.33-4 μm , estas se encuentran de manera más abundante que las macroconidias de forma alargada y curvadas de las puntas, que pueden llegar a medir entre 37.0-55.0 μm con 3 a

5 septos en su interior así como los esporodiquios se han descrito en tener forma de V o de orejas de conejo en las cuales se pueden encontrar conidios en cadena.(Nithiyaa et al. 2012; Kaur et al. 2020; Zácamo-Velázquez et al. 2022).

8.2 Tratamiento del aislado fúngico CMP4 con nanopartículas de plata (“BioArgovit®”)

En el presente estudio se sometió a *F. verticillioides* a cuatro diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (AgNPs) BioArgovit para determinar aquella que no afectara su viabilidad. Se encontró que, a una concentración de 1 mM (107.87µg/ml), no se vio afectado el peso fresco del aislado, con un intervalo de confianza del 95%. Sin embargo, a una concentración menor (100 µM o 10.787 µg/ml), se observó una mayor disminución en el peso fresco del aislado. Por otro lado, a concentraciones de 10 mM (1,0787 µg/ml) y 10 µM (1.0787 µg/ml), se observó una reducción mínima en el peso fresco del aislado, indicando que la concentración de 10 µM podría considerarse como la concentración mínima inhibitoria (MIC). Además, se evidenció el efecto hormético de las AgNPs BioArgovit (figura.14).

Este comportamiento es similar al observado en un estudio previo realizado por Vargas-Obregón (2020) en el mismo laboratorio. En ese estudio, se utilizaron dos hongos diferentes: *Fusarium lacertarum*, un hongo patógeno, y *Beauveria bassiana*, un hongo endófito entomopatógeno. Ambos fueron expuestos a las mismas concentraciones de AgNPs, pero en una versión previa de Argovit diferente a la utilizada en este estudio. Con un protocolo similar, el cual se estandarizó en este trabajo, se encontró un peso constante en los primeros días del experimento y una ligera disminución en el peso fresco de *F. lacertarum*, mientras que *B. bassiana* aumentó su peso al final del experimento. Por lo que se puede comparar el comportamiento entre ambas especies de *Fusarium*.

Esto a su vez se encuentra relacionado con otro estudio con otra versión de AgNPs Argovit en el que se probaron los efectos antifúngicos de las AgNPs frente a *Candida tropicalis* (patógeno) y *Saccharomyces boulardii* (probiótico). A una concentración de 25 µg/ml, las AgNPs inhibieron el 90 % del crecimiento de *C. tropicalis*, aunque se permite el 50% de *S. boulardii* permanezca viable, lo que sugiere un potencial para atacar selectivamente hongos patógenos (Guerra et al. 2020).

Dentro de la literatura se ha reportado un efecto diferente para otros géneros de *Fusarium* con otro tipo de AgNPs, por ejemplo, en un estudio se investigó el impacto de las nanopartículas de plata en hongos *Fusarium solani*. Para ello, se emplearon concentraciones de 0.1; 0.2; 0.5 y 1.0 mg/ml, evaluando la conducta de los hongos a las 24, 48 y 120 horas. Se observó una relación directa entre la cantidad de nanopartículas y la efectividad del tratamiento, indicando que las nanopartículas pueden reducir significativamente el peso fresco de los hongos, impactando negativamente en su biomasa y crecimiento (Moreno-Vargas, 2021). Mientras que, en otro estudio, realizado por Sánchez et al. (2023), se aplicó la inoculación de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* en medio de agar papa dextrosa (PDA) con distintas concentraciones de AgNPs (10, 20, 40, 75 y 150 mg/L). Se evaluó el crecimiento radial cada 24 horas por 7 días a 7 ± 2 °C y se comparó con el control negativo, y encontraron que la concentración de 150 mg/L de AgNPs resultó en una inhibición del 94.6% del crecimiento del hongo, siendo la concentración mínima inhibitoria (MIC) de 75 mg/L, la cual es mayor a la MIC empleada en *F. verticillioides* en el presente trabajo (1.078×10^3 mg/L). Por otra parte, se ha encontrado que las AgNPs sintetizadas a partir de *Streptomyces spp.* a 100 µg/ml inhiben el crecimiento de hifas y la germinación de conidios, y una reducción del 42,85% en la biosíntesis de ergosterol en *F. verticillioides* (Marathe et al. 2020).

Esto contrasta con los resultados presentes, ya que en este estudio no se observó actividad fungicida por parte de las AgNPs. Todos los tratamientos, al finalizar el experimento, fueron re-inoculados por picadura y todos presentaron un crecimiento radial similar, lo que indica que todos eran viables (Figura.15). Además, el conteo de esporas indica que también hay un efecto hormético entre la concentración de AgNPs y la cantidad de esporas producidas. Aunque no se mostró una discrepancia significativa con un nivel de confianza del 95%, se notó que a una dosificación de 100 µM (equivalente a 10.787 µg/ml), se logró la máxima producción de esporas (1.48×10^8 esporas/100 mg de biomasa) (figura 17).

Esto puede deberse al mecanismo de acción de las AgNPs en los hongos, el cual ha sido descrito anteriormente por varios autores. Como se mencionó en los antecedentes, la actividad biológica de las AgNPs está mediada principalmente por sus características fisicoquímicas, como el tamaño, la forma y la cubierta. Una vez determinadas estas

características, las nanopartículas se acumulan en el exterior de la célula debido a la atracción electrostática entre las cargas de la membrana y las de la plata (Ag^+). Posteriormente, ingresan por la membrana, aunque aún no se han identificado receptores de membrana específicos para esto; se ha determinado que los transportadores de cobre (Ctr1) pueden actuar como importadores de plata (Ruta et al. 2018). Una vez dentro de la célula, pueden ocurrir diferentes efectos que ocasionen variaciones metabólicas y morfológicas. Por ejemplo, se genera una aglomeración de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lee et al. 2019). La acumulación de plata induce el eflujo de potasio, lo cual a su vez ocasiona la pérdida de actividad de la H^+ -ATPasa. Si la plata entra en la mitocondria por los canales de cobre (Cu^+), disminuye la cantidad de Cu^+ y la actividad del citocromo c oxidasa, afectando la respiración celular (Mussin y Giusiano, 2022). Además, también afecta a la expresión génica, lo cual puede influir en la producción de metabolitos, micotoxinas y factores patogénicos (Shen et al. 2020; Barros et al. 2021; Li et al. 2022).

Debido a lo anterior, es crucial resaltar la importancia de realizar estudios genómicos de la cepa tanto antes como después de la exposición a las nanopartículas de plata (AgNPs), dado que hay estudios que sugieren que la generación de especies reactivas de oxígeno podría conducir a la pérdida de genes de virulencia y patogenicidad. en hongos como *Candida albicans*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Magnaporthe oryzae*, por mencionar algunos (Fekete et al. 2007, Guo et al. 2011, Yang et al. 2023)

Además, se han descrito en algunos estudios las estrategias para disminuir la producción de fumonisinas (las cuales son una familia de micotoxinas que contaminan al maíz), entre ellas se encuentra el uso de AgNPs las cuales pueden reducir significativamente la producción de fumonisinas por *F. verticillioides* (Kamle et al. 2019). En un estudio se reporta, la disminución de la fumonisina B1 al 85%, producidas por *Aspergillus niger* expuesto a una concentración de 45 ppm de AgNPs (Pietrzak et al. 2015).

Otros de los efectos positivos que puede tener la exposición de *F. verticillioides* es la biosorción de metales, así como en la investigación de Nafady (2021) se demostró que la biomasa liofilizada de *F. verticillioides* endófito y sus nanopartículas de plata, tiene la capacidad de biosorber cadmio de medios acuáticos contaminados. Por otra parte, dentro de los efectos positivos que puede tener este hongo en el medio ambiente es la capacidad

de degradar aceites derivados de petróleo, lo cual fue reportado en el estudio de Al-Otibi et al. (2023) en el cual se estudiaron diferentes especies de *Fusarium* como *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. oxysporum*.

8.3 Tratamiento de las semillas de maíz con el aislado fúngico tratado con AgNPs

Para el presente estudio, se observó que la concentración mínima que favoreció la mejor germinación de semillas de maíz Chalqueño tratadas con biomasa de *F. verticillioides* fue 10 μ M. Esto resultó en un porcentaje de germinación del 14%, similar al tratamiento de 10 mM, ambos mostrando una diferencia significativa con el grupo de control, en el cual las semillas no fueron tratadas con biomasa ni AgNPs. Sin embargo, las semillas sin tratamiento mostraron un porcentaje de germinación del 40%, aunque al compararse con los controles donde solo se trataron las semillas con el hongo, se encontró una diferencia significativa. El hongo crecido en PDB tuvo un porcentaje de germinación del 1%, mientras que en agua fue del 7%. Esto sugiere un aumento en la germinación al utilizar AgNPs a diferentes concentraciones, aunque la germinación fue mayor sin los tratamientos (Figura 22).

Comparado con estudios previos, se encontró que las AgNPs a concentraciones de 5 y 10 μ g/mL promueven el crecimiento sin afectar las raíces o bulbos en cebolla (Casillas-Figueroa et al. 2020). También se aplicaron AgNPs estabilizadas con quitosano en *Fusarium oxysporum* en PDA, y luego, se asperjaron las esporas de este patógeno en semillas germinadas de tomate, y se observó que las nanopartículas de plata (AgNPs) no tuvieron efectos adversos en el desarrollo de las plantas de tomate. Además, se encontró que, a una concentración de 2000 ppm, las AgNPs redujeron los efectos de la infección (Basurto et al. 2020). En pruebas in vitro utilizando semillas de frijol, se encontró que las AgNPs a una concentración de 100 μ g/mL redujeron significativamente el crecimiento de los micelios de varios hongos patógenos, además de mejorar varias métricas de crecimiento y vigor en las plántulas tratadas (Ibrahim et al. 2024).

El patrón de germinación de las semillas tratadas con biomasa cultivada en agua y en PDB puede explicarse por el hecho de que las semillas germinan mejor cuando se tratan con hongos cultivados en agua. Los cuales producen metabolitos beneficiosos y tienen un microbioma más favorable. Además, el agua evita contaminantes y residuos del medio de

cultivo, y ofrece mejores condiciones de oxígeno, pH y salinidad para la germinación (VanderMolen et al. 2013; Jia et al. 2024).

La mayor germinación en las semillas sin control que aquellas tratadas con biomasa puede atribuirse a que los endófitos pueden actuar como patógenos ocultos en condiciones normales y manifestarse como agentes patógenos activos bajo estrés fisiológico. Entre los hongos endofíticos con potencial patogénico se encuentran ejemplos como *Cladosporium*, *Fusarium* y *Colletotrichum* (Alam et al. 2021). La conexión entre hongos endófitos y plantas puede oscilar entre una relación beneficiosa y una perjudicial. Ambos producen sustancias potencialmente dañinas, mientras que la planta desarrolla mecanismos defensivos. Esta interacción depende de un equilibrio entre la agresividad del hongo y las defensas de la planta, influenciado por factores ambientales y etapas de crecimiento. Cuando este equilibrio se rompe, el hongo puede actuar como patógeno, especialmente durante la vejez o el estrés de la planta (Sánchez-Fernández et al. 2013).

Se han identificado hongos endófitos pertenecientes a los géneros *Fusarium* en varias partes de las plantas de maíz, como raíces, tallos, hojas y granos. La colonización de los tejidos del maíz por hongos endófitos del género *Fusarium* se ha asociado con varios síntomas de enfermedad, como la reducción en la circunferencia del tallo, la altura de la planta, la expansión de las hojas, las concentraciones de clorofila y la productividad de las plantas. Además, se han observado respuestas histológicas diversas, incluida la descomposición de las células infectadas (Terna et al. 2022). En otro estudio, se encontró que la infección por *Fusarium* tuvo un impacto mínimo en la germinación de las semillas, pero provocó una disminución en la altura de las plántulas y en la biomasa aérea. Se observó una gravedad de infección variable entre los aislados y una correlación moderada entre la altura de las plántulas y la gravedad de la infección. Sin embargo, no se encontró una correlación entre la reducción de la biomasa de las raíces y la gravedad de la pudrición de la raíz, lo cual coincide con la idea de una desconexión entre los factores de patogenicidad y los síntomas de la enfermedad en el maíz (Leyva-Madrigal et al. 2017). Lo cual podría estar relacionado con el crecimiento del tallo, las hojas y raíces, podrían ser síntomas de patogenicidad, aunque para confirmarlo se necesitan mayores estudios de presencia de micotoxinas o de genes que interfieran en estos procesos patogénicos.

9 CONCLUSIONES

- El aislado de CMP4 fue identificado como *Fusarium verticillioides* mediante técnicas moleculares. Esta identificación concuerda con las características morfológicas observadas, incluida la coloración del micelio que va de rosa a morado en PDA, así como las macroconidias septadas con 2-3 septos internos y la forma alargada con puntas curvadas.
- La concentración de 1 mM no afectó el peso fresco del aislado durante los 15 días de tratamiento, mientras que las demás concentraciones mostraron un efecto hormético tanto en el peso como en la esporulación. Además, ninguna de las concentraciones afectó la viabilidad del aislado cuando se re-inoculó.
- La concentración mínima con mejor germinación fue de 10 μ M, donde se observó un efecto hormético de las AgNPs. Por otro lado, las semillas germinaron más en el control con agua que en el control con PDB, y las semillas sin tratamiento mostraron la mayor tasa de germinación.

10 PERSPECTIVAS

A partir del análisis de los resultados de este proyecto y de la comparación con los datos existentes en la literatura, se propone lo siguiente:

- 1. Estudios de expresión génica pre y post-tratamiento con AgNPs:** Realizar investigaciones sobre la expresión de genes antes y después del tratamiento con nanopartículas de plata (AgNPs), enfocándose especialmente en aquellos genes relacionados con la producción de micotoxinas, como las fumonisinas, que son el principal factor patogénico.
- 2. Profundización en estudios de concentraciones micromolar:** Ampliar los estudios en concentraciones de AgNPs dentro del rango micromolar para entender mejor sus efectos biológicos.
- 3. Aplicación del aislado tratado con AgNPs en otros cultivos:** Explorar la utilización del aislado tratado con AgNPs en diferentes tipos de cultivos para evaluar su eficacia y seguridad.
- 4. Control biológico con aislado tratado:** Investigar el uso del aislado tratado con AgNPs como agente de control biológico contra otras especies patógenas, evaluando su potencial en la bioprotección de cultivos.
- 5. Producción de metabolitos y enzimas biodegradadoras:** Promover la producción de metabolitos y enzimas por el aislado tratado que sean capaces de biodegradar materia orgánica, contribuyendo así a la sostenibilidad y mejora del manejo de residuos agrícolas.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Abasi F, Raja NI, Mashwani ZUR, Amjad MS, Ehsan M, Mustafa N, Haroon M, Proćków J. 2022. Biogenic silver nanoparticles as a stress alleviator in plants: a mechanistic overview. *Molecules*. 27(11):3378.
- Adejumo AL, Azeez L, Kolawole TO, Aremu HK, Adedotun IS, Oladeji RD, Adeleke AE, Abdullah M. 2023. Silver nanoparticles strengthen *Zea mays* against toxic metal-related phytotoxicity via enhanced metal phytostabilization and improved antioxidant responses. *International journal of phytoremediation*. 25(12):1676–1686.
- Adejumo TO, Orole OO. 2009. Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 3(12):969-973
- Adiaha MS, Agba OA, Attoe EE, Ojikpong TO, Kekong MA, Obio A, Undie UL. 2016. Effect of maize (*Zea mays* L.) on human development and the future of man-maize survival: a review. *World Sci News*. 592392-2192.
- Ahmed MS, Soundhararajan R, Akther T, Kashif M, Khan JW, Waseem M, Srinivasan H. 2019. Biogenic AgNPs synthesized via endophytic bacteria and its biological applications. *Environ Sci Pollut Res Int*. 26(26):26939-26946.
- Akhatova F, Konnova S, Kryuchkova M, Batasheva S, Mazurova K, Vikulina A, Volodkin D, Rozhina E. 2023. Comparative characterization of iron and silver

- nanoparticles: extract-stabilized and classical synthesis methods. *Int J Mol Sci.* 24(11):9274.
- Alam B, Li J, Ge Q, Khan MA, Gong J, Mehmood S, Yuan Y, Gong W. 2021. Endophytic fungi: from symbiosis to secondary metabolite communications or vice versa? *Front. Plant Sci.* 12:791033.
- Alavi M, Ashengroph M. 2023. Mycosynthesis of AgNPs: mechanisms of nanoparticle formation and antimicrobial activities. *Expert Review of Anti-infective Therapy.* 21(4):355-363.
- Ali SS, Darwesh OM, Kornaros M, Al-Tohamy R, Manni A, El-Shanshoury AER, Metwally MA, Elsamahy T, Sun J. 2021. Nano-biofertilizers: synthesis, advantages and applications. In: Elsevier eBooks; p. 359-370.
- Al-Otibi F, Al-Zahrani RM, Marraiki N. 2023. Biodegradation of selected hydrocarbons by *Fusarium* species isolated from contaminated soil samples in Riyadh, Saudi Arabia. *J Fungi.* 9(2):216.
- Amin N. 2013. Diversity of endophytic fungi from root of Maize var. Pulut (waxy corn local variety of South Sulawesi, Indonesia). *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2(8):ISSN: 2319-7706.
- Anderson E, Cutler HC. 1942. Races of *Zea mays*: I. Their recognition and classification. *Ann Mo Bot Gard.* 29(2):69.

- Arellano-González J. 2023. Irrigation adaptation and climate change: panel data evidence for maize in Mexico. Banco de México Working Papers. 05. 2157883-7.
- Awata LAO, Beyene Y, Gowda MLS, Jumbo MB, Tongoon P, Danquah E, Ifie BE, Marchelo-Dragga PW, Olsen M, Ogugo V, Mugo S, Prasanna BM. 2019. Genetic analysis of QTL for resistance to maize lethal necrosis in multiple mapping populations. *Genes*. 11(1):32.
- Barros D, Pradhan A, Pascoal C, Cássio F. 2021. Transcriptomics reveals the action mechanisms and cellular targets of citrate-coated silver nanoparticles in a ubiquitous aquatic fungus. *Environ Pollut*. 268:115913.
- Basurto DAE, Carvajal FA, Calderon AA, Soto TEG, Miranda EE, Onofre JJ, Ibarra RM. 2020. Silver nanoparticles coated with chitosan against *Fusarium oxysporum* causing the tomato wilt. *Biotechnia*. 22(3):73-80.
- Bogdanchikova N, Vazquez-Gomez RL, Nefedova E, Garibo D, Pestryakov A, Plotnikov E, Shkil NN. 2024. Nanoparticles partially restore bacterial susceptibility to antibiotics. *Materials*. 17(7):1629.
- Borah M, Das S, Baruah H, Boro RC, Barooah M. 2018. Diversity of culturable endophytic bacteria from wild and cultivated rice showed potential plant growth promoting activities. *bioRxiv*. 310797.
- Brookes JJ. 2017. Endophytes in maize (*Zea mays*) in New Zealand [master's thesis]. Lincoln (NZ): Lincoln University.
- Adejumo, y Orole, O. O. (2008). Activity of

fungal endophytes against four maize wilt pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 3.

Bryła M, Pierzgański A, Zapaśnik A, Uwineza PA, Ksieniewicz-Woźniak E, Modrzewska M, Waśkiewicz A. 2022. Recent research on *Fusarium* mycotoxins in maize—A review. *Foods*. 11(21):3465.

Budhani S, Egboluche NP, Arslan Z, Yu H, Deng H. 2019. Phytotoxic effect of silver nanoparticles on seed germination and growth of terrestrial plants. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 37(4):330-355.

Caballero-García MA, Córdova-Téllez L, López-Herrera ADJ. 2019. Validación empírica de la teoría multicéntrica del origen y diversidad del maíz en México. *Rev Fitotec Mex*. 42(4):357-366.

Canadian Food Inspection Agency (CFIA), Government of Canada. 2021 May 7. The biology of *Zea mays* L. (maize). Available from: <https://inspection.canada.ca/plant-varieties/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l-maize-/eng/1330985739405/1330985818367>

Cao A, De la Fuente M, Gesteiro N, Santiago R, Malvar RA, Butrón A. 2022. Genomics and pathways involved in maize resistance to *Fusarium* ear rot and kernel contamination with fumonisins. *Front Plant Sci*. 13:866478

- Casillas-Figueroa FA, Arellano-García ME, Iracheta I. 2018. Obtención de nanopartículas de plata (NPs Ag) en diferentes medios de reacción acuosa utilizando fructosa. *Tecciencia*. 13(24):35-42.
- Cekuolyte K, Gudiukaite R, Klimkevicius V, Mazrimaite V, Maneikis A, Lastauskiene E. 2023. Biosynthesis of silver nanoparticles produced using *Geobacillus* spp. bacteria. *Nanomaterials* [Internet]. 13(4):702.
- Chaudhary D, Deep A, Bansal N, Rani N. 2023. Methods of synthesis, characterization and anticancer potential of herbal silver nanoparticles: a review. *Curr Cancer Ther Rev*. 19(4):318-333.
- Chen S, Yan X, Peralta-Videa JR, Su Z, Hong J, Zhao L. 2023. Biological effects of AgNPs on crop plants: environmental implications and agricultural applications. *Environ Sci Nano*. 10(1):62-71.
- Chhipa H, Deshmukh SK. 2018. Fungal endophytes: rising tools in sustainable agriculture production. In: Rai M, Singh J, editors. *Bioactive molecules in food*. Springer; p. 1-24.
- CONABIO. 2020a. Chalqueño. Biodiversidad Mexicana. Recuperado 16 de febrero de 2023. Disponible en: <https://biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/razas/grupo-conico/chalqueno>.

CONABIO. 2020b. Grupo cónico. Biodiversidad Mexicana. Recuperado 16 de febrero de 2023. Disponible en: <https://biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/razas/grupo-conico>.

CONABIO. 2020c. Razas de maíz de México. Biodiversidad Mexicana. Recuperado 25 de enero de 2023. Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/razas-de-maiz>.

Corral JAR, De Jesús Sánchez González J, Casillas JMH, Willcox MC, Ojeda GR, Díaz JLR, Eguiarte DRG. 2013. Identification of Mexican maize races adapted to moisture deficient conditions using biogeographical data. *Rev Mex Cienc Agríc.* 4(6):829-842.

De La Caridad Esquivel-Figueroa R, Mas-Diego SM. 2021. Síntesis biológica de nanopartículas de plata: revisión del uso potencial de la especie *Trichoderma*. *Rev Cubana Quím.* 33(2):23-45.

Deepa N, Sreenivasa MY. 2017. *Fusarium verticillioides*, a globally important pathogen of agriculture and livestock: a review. *J Vet Med Res.* 4(4):1084.

Deepa N, Achar PN, Sreenivasa MY. 2021. Current perspectives of biocontrol agents for management of *Fusarium verticillioides* and its fumonisin in cereals—A review. *J Fungi.* 7(9):776.

Degani O, Regev D, Dor S. 2021. The microflora of maize grains as a biological barrier against the late wilt causal agent, *Magnaporthe oryzae*. *Agronomy.* 11(5):965.

- Devadharshini R, Karpagam G, Pavithra K, Kowsalya S, Priya PM, Ramachandran AM. 2023. Green synthesis of silver nanoparticles. *Microbiol Res J Int.* 33(5):1-9.
- Ebrahim W, Özkaya FC, Ebada SS. 2020. Antifungal metabolites from endophytic fungus *Fusarium verticillioides* strain WF18. *South Afr J Bot.* 133:40-44.
- Ebrahimi L, Hatami Rad S, Etebarian HR. 2022. Apple endophytic fungi and their antagonism against apple scab disease. *Front Microbiol.* 13:1024001.
- Erenstein O, Jaleta M, Sonder K, Mottaleb KA, Prasanna BM. 2022. Global maize production, consumption and trade: trends and RyD implications. *Food Sec.* 14(5):1295-1319.
- FAO [Food and Agriculture Organization of the United Nations]. 2016. Save and grow in practice: maize, rice and wheat. A guide to sustainable food and agriculture.
- FAOStat. 2021. FAO Stat. FAO, Rome. <http://www.fao.org/faostat>
- Fekete A, Emri T, Gyetvai Á, Gazdag Z, Pesti M, Varga Z, Balla J. 2007. Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a t-butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 7(6):834-847.
- Ganash EA. 2022. Synthesis of silver nanoparticles using pulsed laser ablation in liquid: a review. *Laser Phys Lett.* 20(1):013001.

- Gil Martínez M. 2022. Efecto de las nanopartículas de plata Argovit™ en la microalga *Chattonella* sp. [tesis de maestría]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- González Vega JG. 2022. Comparación del efecto citotóxico de nanopartículas de plata en modelos con líneas celulares y cultivos primarios [tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Baja California.
- Grover M, Ali SZ, Sandhya V, Rasul A, Venkateswarlu B. 2010. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World J Microbiol Biotechnol.* 27(5):1231-1240.
- Guerra JD, Sandoval G, Avalos-Borja M, Pestryakov A, Garibo D, Susarrey-Arce A, Bogdanchikova N. 2020. Selective antifungal activity of silver nanoparticles: a comparative study between *Candida tropicalis* and *Saccharomyces boulardii*. *Colloids Interface Sci Commun.* 37:100280.
- Guo M, Chen Y, Du Y, Dong Y, Guo W, Zhai S, Zhang H, Dong S, Zhang Z, Wang Y, Wang P. 2011. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog.* 7(2).
- Gupta SD, Agarwal A, Pradhan S. 2018. Phytostimulatory effect of silver nanoparticles (AgNPs) on rice seedling growth: an insight from antioxidative enzyme activities and gene expression patterns. *Ecotoxicol Environ Saf.* 161:624-633.

- Habibullah G, Viktorova J, Ruml T. 2021. Current strategies for noble metal nanoparticle synthesis. *Nanoscale Res Lett.* 16(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03480-8>.
- Hassani MA, Durán P, Hacquard S. 2018. Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome.* 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0445-0>.
- Hernández A. 2019 Nov 11. ¿Cuál es la diferencia entre maíz nativo, híbrido y transgénico? Hablemos del Campo. <https://www.hablemosdelcampo.com/cual-es-la-diferencia-entre-maiz-nativo-hibrido-y-transgenico/>.
- Hernández-Salinas G, Toledano-Toledano F, Pérez-García M, Sánchez-Valera OV, Ramírez-Rivera EDJ, Serna-Lagunes R, Rocandio-Rodríguez M, Purroy-Vásquez R, Fernández-López CL, López-Morales F, Garduño-Espinosa J. 2022. Morpho-agronomic evaluation of native maize races associated with Mexican tropical climate agroforestry systems. *PLOS ONE.* 17(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269896>.
- Hoang AS, Cong HH, Shukanov VP, Karytsko LA, Poljanskaja SN, Melnikava EV, Mashkin IA, Nguyen TH, Pham DK, Phan CM. 2022. Evaluation of metal nanoparticles as growth promoters and fungi inhibitors for cereal crops. *Chem Biol Technol Agric.* 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00277-w>.
- Hubbard M, Germida J, Vujanovic V. 2014. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. *J Appl Microbiol.* 116(1):109-122. <https://doi.org/10.1111/jam.12311>.

- Hussain R, Mushtaq N, Ahmed M, Sher N. 2023. Response of maize (*Zea mays* L.) seed germination and seedling growth to plant-mediated silver nanoparticles and nickel chloride. 10.21203.
- Ibrahim E, Ahmad AA, Abdo E, Bakr MA, Khalil MA, Abdallah Y, Ogunyemi SO, Mohany M, Al-Rejaie SS, Shou L, Li B, Galal AA. 2024. Suppression of root rot fungal diseases in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) through the application of biologically synthesized silver nanoparticles. *Nanomaterials*. 14(8):710.
- Ikram M, Ali N, Jan G, Jan FG, Rahman IU, Iqbal A, Hamayun M. 2018. IAA producing fungal endophyte *Penicillium roqueforti* Thom., enhances stress tolerance and nutrients uptake in wheat plants grown on heavy metal contaminated soils. *PLOS ONE*. 13(11).
- Jain AS, Pawar PS, Sarkar A, Junnuthula V, Dyawanapelly S. 2021. Bionanofactories for green synthesis of silver nanoparticles: Toward antimicrobial applications. *Int J Mol Sci*. 22(21):11993.
- Jaskulski D, Jaskulska I, Majewska J, Radziemska M, Bilgin A, Brtnicky M. 2022. Silver nanoparticles (AgNPs) in urea solution in laboratory tests and field experiments with crops and vegetables. *Materials*. 15(3):870.
- Jia X, Song J, Wu Y, Feng S, Sun Z, Hu Y, Yu M, Han R, Zeng B. 2024. Strategies for the enhancement of secondary metabolite production via biosynthesis gene cluster regulation in *Aspergillus oryzae*. *J Fungi*. 10(5):312.

- Jiang L, Xiang S, Lv X, Wang X, Li F, Liu W, Liu C, Ran M, Huang J, Xu X, Ma X, Jin Y, Sun X. 2022. Biosynthesized silver nanoparticles inhibit *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* by directly destroying bacteria and inducing plant resistance in *Nicotiana benthamiana*. *Phytopathology Research*. 4(1)
- Johnston-Monje D, Raizada MN. 2011. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS ONE*. 6(6).
- Kamle M, Mahato DK, Devi S, Lee KE, Kang SG, Kumar P. 2019. Fumonisin: impact on agriculture, food, and human health and their management strategies. *Toxins*. 11(6):328.
- Kanakari E, Dendrinou-Samara C. 2023. Fighting phytopathogens with engineered inorganic-based nanoparticles. *Materials*. 16(6):2388.
- Karim S, Kayani S, Akhtar W, Fatima I, Nazir M, Zaman W. 2023. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Funaria hygrometrica* Hedw. and their effects on the growth of *Zea mays* seedlings. *Microsc Res Tech*. 86(6):686-693.
- Kato Yamanake TA, Mapes Sánchez C, Mera Ovando LM, Serratos Hernández JA, Bye Boettler RA. 2009. Origen y diversificación del maíz, una revisión analítica. 1.a ed. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/proyectoMaices/origenDiv>.

- Kaur K, Kaur J, Puyam A, Singh K. 2020. Cultural, morphological and molecular characterization of *Fusarium verticillioides* causing maize ear rot under Punjab condition. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 9(10):1698-1706.
- Khan S, Zahoor M, Khan RS, Ikram M, Islam NU. 2023. The impact of silver nanoparticles on the growth of plants: the agriculture applications. *Heliyon*. 9(6)
- Kumar KK, Dara SK. 2021. Fungal and bacterial endophytes as microbial control agents for plant-parasitic nematodes. *Int J Environ Res Public Health*. 18(8):4269.
- Lahuta LB, Szablińska-Piernik J, Stałanowska K, Głowacka K, Horbowicz M. 2022. The size-dependent effects of silver nanoparticles on germination, early seedling development and polar metabolite profile of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Int J Mol Sci*. 23(21):13255.
- Lee B, Lee MJ, Yun SJ, Kim K, Choi I, Park S. 2019. Silver nanoparticles induce reactive oxygen species-mediated cell cycle delay and synergistic cytotoxicity with 3-bromopyruvate in *Candida albicans*, but not in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Nanomedicine*. 14:4801-4816.
- Lee K, Pan JJ, May G. 2009. Endophytic *Fusarium verticillioides* reduces disease severity caused by *Ustilago maydis* on maize. *FEMS Microbiol Lett*. 299(1):31-37.
- Leyva-Madrigal KY, Sandoval-Castro E, Calderón-Vázquez CL, Larralde-Corona CP, Maldonado-Mendoza IE. 2017. Pathogenic and genetic variability of *Fusarium verticillioides* from maize in northern Mexico. *Can J Plant Pathol*. 39(4):486-496.

- Li C, Dang F, Li M, Zhu M, Zhong H, Hintelmann H, Zhou D. 2017. Effects of exposure pathways on the accumulation and phytotoxicity of silver nanoparticles in soybean and rice. *Nanotoxicology*. 11(5):699-709.
- Li L, Pan H, Deng L, Qian G, Wang Z, Li W, Zhong C. 2022. The antifungal activity and mechanism of silver nanoparticles against four pathogens causing kiwifruit post-harvest rot. *Front Microbiol*. 13.
- Li Y, Cummins E. 2022. Probabilistic risk assessment of AgNPs for human health through dietary consumptions of crops. *Environ Sci Nano*. 9(8):3049-3065.
- Liu Y, Zuo S, Zou Y, Wang J, Song W. 2012. Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. *Ann Microbiol*. 63(1):71-79.
- Maesaroh K, Permana MD, Eddy DR, Rahayu I. 2023. The effect of different synthesis with chemical and biological methods on properties of silver oxide nanoparticles. *Trends Sci*. 20(3):4350. <https://doi.org/10.48048/tis.2023.4350>.
- Manjaiah KM, Mukhopadhyay R, Paul R, Datta SC, Kumararaja P, Sarkar B. 2019. Clay minerals and zeolites for environmentally sustainable agriculture. In: Elsevier eBooks, pp. 309-329.
- Marathe K, Naik J, Maheshwari V. 2020. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Streptomyces* spp. and their antifungal activity against *Fusarium verticillioides*. *J Cluster Sci*. 32(5):1299-1309.

Matras E, Gorczyca A, Pocięcha E, Przemieniecki SW, Żeliszewska P, Oćwieja M. 2023.

Silver nanoparticles affect wheat (*Triticum aestivum* L.) germination, seedling blight and yield. *Funct Plant Biol.* 50(5):390-406.

Mirsam H, Kalqutny SH, Suriani, Aqil M, Azrai M, Pakki S, Muis A, Djaenuddin N, Rauf AW, Muslimin. 2021. Indigenous fungi from corn as a potential plant growth promoter and its role in *Fusarium verticillioides* suppression on corn. *Heliyon.* 7(9).

Mishra S, Singh HB. 2014. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99(3):1097-1107.

More PR, Pandit S, De Filippis A, Franci G, Mijakovic I, Galdiero M. 2023. Silver nanoparticles: bactericidal and mechanistic approach against drug resistant pathogens. *Microorganisms.* 11(2):369.

Moreno-Vargas JM. 2021. Síntesis verde de nanopartículas de plata para aplicaciones como fungicida en los fitopatógenos *Fusarium solani* y/o *Rhizopus stolonifer* que atacan la planta de aguacate [Master's thesis]. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.

Mussin J, Giusiano G. 2022. Biogenic silver nanoparticles as antifungal agents. *Front Chem.* 10.

- Nafady N. 2021. Cadmium biosorption potential and kinetic behavior of endophytic *Fusarium verticillioides* and its green synthesized silver nanoparticles (GSNPs). *Global NEST J.* 23 (3): 449-457.
- Naik LS, Devi CVR. 2021. Phyto-fabricated silver nanoparticles inducing microbial cell death via reactive oxygen species-mediated membrane damage. *IET Nanobiotechnology.* 15(5):492-504.
- Nithiyaa P, Izzati MZNA, Kalsom YU, Salleh B. 2012. Diversity and morphological characteristics of *Aspergillus* species and *Fusarium* species isolated from cornmeal in Malaysia. *Pertanika J Trop Agric Sci.* 35(1):103-116.
- Shydlovska O, Kharchenko YE. 2022. Review of green methods of synthesis of silver nanoparticles. 2068-0783.
- Ortega Coronado A, Guerrero Herrera MJ, Cota Agramont O, Hernández Casillas JM, Peinado Fuentes LA. 2008. Proyecto FZ002: Conocimiento de la diversidad y distribución actual del maíz nativo y sus parientes silvestres en México.
- Olvera-Aguilar DM, Rincón-Sánchez F, Ruiz-Torres NA, Martínez-Reyna JM, Petrolí-Leguiza CD. 2023. Morphological characterization of native maize populations of the Ratón race from Coahuila, Mexico. *Agrociencia.* 58(4).
- Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM. 2008. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *J Invertebr Pathol.* 98(3):267-270.

- Perales H, Golicher D. 2014. Mapping the diversity of maize races in Mexico. PLoS ONE. 9(12).
- Phoemthaisong T, Ksapabutr B, Chaikut N, Panapoy M. 2023. Biosynthesis of silver nanoparticles using extract of banana peel waste assisted by microwave irradiation. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 1280(1):012013.
- Pietrzak K, Twarużek M, Czyżowska A, Kosicki R, Gutarowska B. 2015. Influence of silver nanoparticles on metabolism and toxicity of moulds. Acta Biochimica Polonica. 62(4):851-857.
- Pitt J. 2014. Mycotoxins: fumonisins. In: Elsevier eBooks. pp. 299-303.
- Potshangbam M, Devi SI, Sahoo D, Strobel GA. 2017. Functional characterization of endophytic fungal community associated with *Oryza sativa* L. and *Zea mays* L. Frontiers in Microbiology. 8.
- Radhakrishnan R, Khan AL, Kang SM, Lee I. 2014. A comparative study of phosphate solubilization and the host plant growth promotion ability of *Fusarium verticillioides* RK01 and *Humicola* sp. KNU01 under salt stress. Annals of Microbiology. 65(1):585-593.
- Rai M, Ingle AP, Trzcińska-Wencel J, Wypij M, Bonde S, Yadav A, Kratošová G, Golińska P. 2021. Biogenic silver nanoparticles: what we know and what do we need to know? Nanomaterials. 11(11):2901.

- Rajeshkumar S, Jeevitha M, Sheba D, Nagalingam M. 2022. Bacterial and fungal mediated synthesis, characterization and applications of AgNPs. In: Elsevier eBooks. pp. 165-186.
- Ramírez-Vega H, Vázquez-Carrillo G, Muñoz-Rosales GM, Martínez-Loperena R, Heredia-Nava D, Martínez-Sifuentes JN, Anaya-Esparza LM, Gómez-Rodríguez VM. 2022. Physical and chemical characteristics of native maize from the Jalisco Highlands and their influence on the nixtamalization process. *Agriculture*. 12(9):1293.
- Ribeiro LG, Roque GSC, Conrado R, De Souza AO. 2023. Antifungal activity of mycogenic silver nanoparticles on clinical yeasts and phytopathogens. *Antibiotics*. 12(1):91.
- Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*. 182(2):314-330.
- Rouf Shah T, Prasad K, Kumar P. 2016. Maize: a potential source of human nutrition and health: a review. *Cogent Food y Agriculture*. 2(1).
- Russo ML, Scorsetti AC, Vianna MF, Cabello M, Ferreri N, Pelizza S. 2019. Endophytic effects of *Beauveria bassiana* on corn (*Zea mays*) and its herbivore, *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects*. 10(4):110.
- Ruta LL, Banu MA, Neagoe AD, Kissen R, Bones AM, Farcasanu IC. 2018. Accumulation of Ag(I) by *Saccharomyces cerevisiae* cells expressing plant metallothioneins. *Cells*. 7(12):266.

- Saenz AO, Varela AS, Téllez LC, Hernández VA, Gallardo JM, Martínez FVC. 2020. Mexican maize landraces for corn on the cob production at the Central Highlands. *Maydica*. 64(2):8.
- Sami F, Siddiqui H, Hayat S. 2020. Impact of silver nanoparticles on plant physiology: a critical review. In: *Sustainable agriculture reviews*. pp. 111-127.
- Sánchez KLM, Martínez HDRG, Cerritos RC, Espinosa JCM. 2023. In vitro evaluation of the antifungal effect of AgNPs on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Nanomaterials*. 13(7):1274.
- Sánchez-Bautista A, De León-García de Alba C, Aranda-Ocampo S, Zavaleta-Mejía E, Nava-Díaz C, Goodwin PH, Leyva-Mir SG. 2018. Bacterias endófitas de la raíz en líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*. 36(1).
- Sánchez-Fernández RE, Sánchez-Ortiz BL, Sandoval-Espinosa YKM, Ulloa-Benítez Á, Armendáriz-Guillén B, García-Méndez MC, Macías-Rubalcava ML. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP/Tip Revista Especializada En Ciencias Químico-biológicas*. 16(2):132-146.
- Sandhya V, Shrivastava M, Ali SZ, Sai Shiva Krishna Prasad V. 2017. Endophytes from maize with plant growth promotion and biocontrol activity under drought stress. *Russian Agricultural Sciences*. 43(1):22-34.

- Sangamesh MB, Jambagi S, Vasanthakumari MM, Shetty NJ, Kolte H, Ravikanth G, Nataraja KN, Uma Shaanker R. 2017. Thermotolerance of fungal endophytes isolated from plants adapted to the Thar Desert, India. *Symbiosis*. 75(2):135-147.
- Santillán-Fernández A, Salinas-Moreno Y, Valdez-Lazalde JR, Bautista-Ortega J, Pereira-Lorenzo S. 2021. Spatial delimitation of genetic diversity of native maize and its relationship with ethnic groups in Mexico. *Agronomy*. 11(4):672.
- Santoscoy-Berber LS, Antunes-Ricardo M, Gallegos-Granados MZ, García-Ramos JC, Pestryakov A, Toledano-Magaña Y, Bogdanchikova N, Chavez-Santoscoy RA. 2021. Treatment with Argovit® silver nanoparticles induces differentiated postharvest biosynthesis of compounds with pharmaceutical interest in carrot (*Daucus carota* L.). *Nanomaterials*. 11(11):3148.
- Saucedo-García A, Anaya AL, Espinosa-García FJ, González MC. 2014. Diversity and communities of foliar endophytic fungi from different agroecosystems of *Coffea arabica* L. in two regions of Veracruz, Mexico. *PLoS ONE*. 9(6).
- Schulz B, Boyle C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*. 109(6):661-686.
- Shang Y, Hasan MK, Ahammed GJ, Li M, Yin H, Zhou J. 2019. Applications of nanotechnology in plant growth and crop protection: a review. *Molecules*. 24(14):2558.

- Shen T, Wang Q, Li C, Zhou B, Li Y, Liu Y. 2020. Transcriptome sequencing analysis reveals silver nanoparticles antifungal molecular mechanism of the soil fungi *Fusarium solani* species complex. *Journal of Hazardous Materials*. 388:122063.
- Shende S, Rajput V, Minkina T, Sushkova S, Mandzhieva S. 2023. Strategic role of nanotechnology in plant growth improvement and crop production. In: Elsevier eBooks. pp. 25-49.
- Shukla K, Mishra V, Singh J, Varshney V, Verma R, Srivastava S. 2024. Nanotechnology in sustainable agriculture: a double-edged sword. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Siddiqi KS, Husen A. 2021. Plant response to silver nanoparticles: a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 42(7):973-990.
- Solano-Báez AR, De León-García de Alba C, Valdovinos-Ponce G, Silva-Rojas HV, Soto-Rojas L. 2011. La pigmentación de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) como factor de virulencia en plántulas de maíz. *Agronomía Mesoamericana*. 22(2):297.
- Stephano-Hornedo JL, Torres-Gutiérrez O, Toledano-Magaña Y, Gradilla-Martínez I, Pestryakov A, Sánchez-González A, García-Ramos JC, Bogdanchikova N. 2020. ArgovitTM silver nanoparticles to fight Huanglongbing disease in Mexican limes (*Citrus aurantifolia* Swingle). *RSC Advances*. 10(11):6146-6155.
- Surega R, Anita B, Ramakrishnan S, Gunasekaran K, Nakkeran S. 2020. Synthesis and characterization of AgNps using plant extracts. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 9(2):1939-1947.

- Tariq M, Mohammad KN, Ahmed B, Siddiqui MA, Lee J. 2022. Biological synthesis of silver nanoparticles and prospects in plant disease management. *Molecules*. 27(15):4754.
- Terna TP, Nor NMIM, Zakaria L. 2022. Histopathology of corn plants infected by endophytic fungi. *Biology*. 11(5):641.
- Valenzuela-Salas LM, Blanco-Salazar A, Perrusquía-Hernández JD, Nequiz-Avendaño M, Mier-Maldonado PA, Ruiz-Ruiz B, Campos-Gallegos V, Arellano-García ME, García-Ramos JC, Pestryakov A, Villarreal-Gómez LJ, Toledano-Magaña Y, Bogdanchikova N. 2021. New protein-coated silver nanoparticles: characterization, antitumor and amoebicidal activity, antiproliferative selectivity, genotoxicity, and biocompatibility evaluation. *Pharmaceutics*. 13(1):65.
- VanderMolen KM, Raja HA, El-Elimat T, Oberlies NH. 2013. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express*. 3(1):71.
- Vargas-Obregón BL. 2020. Efecto de nanopartículas de plata sobre el metabolismo de *Beauveria bassiana* y *Fusarium lacertarum* [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Wang JL, Li T, Liu GY, Smith JM, Zhao ZW. 2016. Unraveling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zea mays*) under cadmium stress: physiological, cytological and genic aspects. *Scientific Reports*. 6(1).

- Wang Z, Liu J, White JF, Li C. 2022. *Epichloë bromicola* from wild barley improves salt-tolerance of cultivated barley by altering physiological responses to salt stress. *Frontiers in Microbiology*. 13.
- Waqas M, Khan AL, Lee IJ. 2013. Bioactive chemical constituents produced by endophytes and effects on rice plant growth. *Journal of Plant Interactions*. 9(1):478-487.
- Wen H, Shi H, Jiang N, Qiu J, Lin F, Kou Y. 2023. Antifungal mechanisms of silver nanoparticles on mycotoxin producing rice false smut fungus. *iScience*. 26(1):105763.
- Wen J, Okyere SK, Wang S, Wang J, Xie L, Ran Y, Hu Y. 2022. Endophytic fungi: an effective alternative source of plant-derived bioactive compounds for pharmacological studies. *Journal of Fungi*. 8(2):205.
- Xing H, Ma J, Xu B, Zhang S, Wang J, Cao L, Yang X. 2018. Mycobiota of maize seeds revealed by rDNA-ITS sequence analysis of samples with varying storage times. *MicrobiologyOpen*. 7(6).
- Yan L, Zhu J, Zhao X, Shi J, Jiang C, Shao D. 2019. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103: 3327–3340
- Yang C, Tang L, Qin L, Zhong W, Tang X, Gong X, Xie W, Li Y, Xia S. 2023. mRNA turnover protein 4 is vital for fungal pathogenicity and response to oxidative stress in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pathogens*. 12(2):281.

Zácamo-Velázquez NY, Ireta-Moreno J, Salinas-Moreno Y, Gómez-Rodríguez VM, Ramírez-Vega H, Martínez-Loperena R. 2022. Variabilidad morfológica/patogénica de *Fusarium verticillioides* en la Ciénega/Chapala, México y evaluación de técnicas de inoculación. *Agronomía Mesoamericana*. 34 (1): 49679.

Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. 2016. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(9):1534.

Zhang P, Gong J, Jiang Y, Long Y, Lei W, Gao X, Guo D. 2023. Application of silver nanoparticles in parasite treatment. *Pharmaceutics*. 15(7):1783. doi: 10.3390/pharmaceutics15071783.