



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

BOTÁNICA

**NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LA SIMBIOSIS
MICORRÍZICA ARBUSCULAR Y ANATOMÍA
RADICAL DE *Trifolium repens* L.**

ABIGAIL MENDIETA MORALES

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019



CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe, “**Abigail Mendieta Morales**”, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección de la Profesora “**Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera**”, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis “**NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA ARBUSCULAR Y ANATOMÍA RADICAL DE *Trifolium repens L.***”, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Texcoco, Estado de México, a 26 de abril de 2019

Abigail Mendieta Morales

Vo. Bo. Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera
Profesora Consejera

La presente tesis titulada: “**Nanopartículas de plata en la simbiosis micorrízica arbuscular y anatomía radical de *Trifolium repens* L**” realizada por la alumna: “**Abigail Mendieta Morales**” bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



DRA. HILDA ARACELI ZA VALETA MANCERA

ASESOR



DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESOR



DR. DANIEL PADILLA CHACÓN

Montecillo, Texcoco, Estado de México, abril de 2019

NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA ARBUSCULAR Y ANATOMÍA RADICAL DE *Trifolium repens* L.

Abigail Mendieta Morales, M en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

Los efectos positivos de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) sobre el crecimiento, desarrollo y nutrición mineral en las plantas, es bien conocido; no obstante, es limitado el conocimiento del efecto de nanopartículas de plata (NPs de Ag) en el establecimiento e interacción sobre estos microorganismos. La presente investigación evaluó el efecto NPs de Ag, producidas por biosíntesis con extracto vegetal, en el establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular *Rhizophagus intraradices* y *Trifolium repens* L. El experimento se mantuvo bajo condiciones controladas de cámara de crecimiento, la inoculación, siembra y aplicación de tratamientos se realizaron bajo un diseño experimental factorial 2x4 en DECA y análisis estadístico (ANDEVA, $p \leq 0.05$ de una y dos vías y Tukey-DSH). Semillas de *T. repens* fueron sembradas en sustrato (arena+perlita) con inóculo de *R. intraradices* (HMA) y NPs de Ag (21.61 ± 0.44 nm) biosintetizadas con extracto de *Camelia sinensis* (0, 1, 10 y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Después de 90 d, *R. intraradices* establece simbiosis en el sistema radical de *T. repens*. En las plantas sin HMA (-HMA) se presentó el efecto dosis-respuesta hormético; en presencia de 1 y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs de Ag, aumentó la biomasa seca de vástago y el área foliar, con $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ se incrementó el número de esporas y la colonización micorrízica arbuscular. El aumento de la concentración de NPs Ag ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), redujo el porcentaje de colonización y número de esporas y con y sin inoculación (+HMA y -HMA) la biomasa fresca y seca de vástago, la biomasa fresca de raíz, el área foliar, fluorescencia de la clorofila se vieron afectadas. La presencia de NPs de Ag en el sustrato, no modificó la anatomía secundaria de la raíz de trébol blanco, pero la inoculación con HMA no impide la acumulación de Ag en la raíz.

Palabras clave: *Trifolium repens*, *Rhizophagus intraradices*, NPs de Ag, simbiosis micorrízica arbuscular, hormesis, raíz.

SILVER NANOPARTICLES ON THE ARBUSCULAR MYCORRHIZAL SYMBIOSIS AND ROOT ANATOMY OF *Trifolium repens* L.

Abigail Mendieta Morales, MSc.

Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

The positive effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on growth, development and mineral nutrition in plants is well known; however, knowledge of the effect of silver nanoparticles (Ag NPs) on the establishment and interaction of these microorganisms is limited. The present investigation evaluated the effect of silver nanoparticles (Ag NPs), produced by biosynthesis with plant extract, in the establishment of the arbuscular mycorrhizal symbiosis *Rhizophagus intraradices* and *Trifolium repens* L. The experiment was maintained under controlled conditions of growth chamber, inoculation, sowing and application of treatments were carried out under a 2x4 factorial experimental design in DECA and statistical analysis (ANOVA, $p \leq 0.05$ of one and two ways and Tukey-DSH). Seeds of *T. repens* were sown in substrate (sand + perlite) with inoculum of *R. intraradices* (AMF) and Ag NPs (21.61 ± 0.44 nm) biosynthesized with *Camelia sinensis* extract (0, 1, 10 and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). After 90 d, *R. intraradices* established symbiosis in the root system of *T. repens*. In the plants without AMF (-AMF) the hormetic dose-response effect was presented: in the presence of 1 and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Ag NPs, the dry biomass of shoot and the leaf area, with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ the number of spores and the arbuscular mycorrhizal colonization increased. The increase in the concentration of Ag NPs ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), reduced the percentage of colonization and number of spores and with and without inoculation (+ AMF and -AMF) the fresh and dry weight shoot, the fresh weight root, the leaf area, fluorescence of chlorophyll were affected. The presence of Ag NPs in the substrate did not modify the secondary anatomy of roots of the white clover, but the AMF inoculation does not prevent the accumulation of Ag in the root.

Key words: *Trifolium repens*, *Rhizophagus intraradices*, Ag NPs, arbuscular mycorrhizal symbiosis, hormetic, root.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), por la beca proporcionada para la realización de esta Tesis.

Al Colegio de Postgraduados, por brindarme los espacios y la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

A mi consejera la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera por aceptarme a formar parte de su equipo de trabajo, por el apoyo y paciencia brindada, por enseñarme a crecer.

A mi consejo particular: Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera, Dr. Ronald Ferrera Cerrato y Dr. Daniel Padilla Chacón, por sus asesorías, sugerencias e información prestada para la realización de este trabajo.

A la Unidad de Microscopía Electrónica (UME) del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo por la facilidad de los equipos y el apoyo en la observación de las muestras.

Al Laboratorio de Microbiología, Colegio de Postgraduados, por brindarme el espacio y material necesario para procesar muestras.

A la Unidad de Cámaras de Ambiente Controlado del Departamento de Botánica, Colegio de Postgraduados, por el espacio a las unidades experimentales y al Sr. Telésforo Sánchez por el apoyo en el mantenimiento de las condiciones de la cámara.

Al Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) por las imágenes de NPs de Ag con Microscopía Electrónica de Transmisión.

Al Laboratorio de Parámetros Ambientales, de la Universidad Autónoma de Chihuahua por el análisis de las muestras de la concentración de plata en raíz.

A los doctores Libia Iris Trejo Téllez, Javier Suárez Espinoza, Rodolfo García Nava, que sin formar parte de mi consejo me brindaron su apoyo y asesorías.

A los Doctores Josue Kohashi Shibata, Ebandro Uscanga, y M. C Antonio García por el espacio en su laboratorio para levantar el experimento y material proporcionado.

Al Alejandro Alarcón por sus asesorías, material proporcionado, ayuda prestada en el laboratorio y buenas aportaciones en la redacción final de esta tesis.

Al Biól. Orlando Catalán por el apoyo, facilitar material y enseñarme las metodologías del área de microbiología.

A la M. en C. Johana Zarate Escobedo por la ayuda en una parte del levantamiento del experimento y la realización de los cortes anatómicos y la M. en C. Itzel Villegas Velázquez por los consejos y asesorías en la redacción del manuscrito.

A la Dra. Susana Adriana Montaña Arías por el apoyo, aportaciones y buenos consejos en la redacción de esta tesis. Gracias por tu amistad y eres una increíble persona

Al personal de la UME, Biól. Simón Morales Rodríguez e Ing. Esthela Torres Torres por el apoyo en las metodologías, facilitar el material y su buena disposición para ayudar.

A mis compañeros de la UME, Amelia López H., Susana Montaña A., Esthela Torres T., Simón Morales R., Johana Zarate E., quienes compartieron conmigo su amistad, consejos, risas, pláticas, comidas, etc., e hicimos un gran equipo y espero seguir contando con su invaluable amistad.

A todos los compañeros que hice en el colegio Alfredo, José Luis, Dani (chiquillo), Beto, Macri, que me animaban cada vez que los encontraba.

A mi amiga del alma Rut Cornejo Espinoza, por su inmensa amistad, apoyo en los momentos difíciles y consejos. Mil gracias por animarme a estudiar la Maestría, compartimos esta hermosa experiencia del posgrado. ¡Eres más que una amiga!

DEDICATORIA

A DIOS, por permitirme vivir esta vida tan hermosa, que me da fuerza para aprender y seguir adelante.

A mi ESPOSO Juan Carlos Meraz Ayala, por tu gran apoyo, amor y paciencia, por aguantarme en mis peores momentos de estrés, tristeza, enojos y, a pesar de todo, estar ahí, platicando conmigo para no rendirme y motivándome a seguir.

A mi FAMILIA, por estar a mi lado. Felipe Mendieta y Leticia Morales, papás, los adoro con todo mi corazón, gracias por enseñarme a conseguir lo bueno de esta vida con esfuerzo, han sido un gran ejemplo para mí, veo su fortaleza y su gran amor al trabajo, quiero ser como ustedes que nunca se rinden. Hermanos (Victor, Luis) y cuñados muchas gracias por ayudarme en la realización de mi experimento, sobre todo a ti Mayra, mi hermanita querida, por tu gran ayuda. A todos les agradezco sus pláticas, consejos y momentos inolvidables.

Pero sobretodo le dedico esta tesis a mi ANGELITO, ya no estás conmigo mi amor, después de la gran tristeza que dejó tu adiós, fuiste el motivo para terminar, cuando ya no podía seguir, te hubiera sentido muy orgulloso de mí.

CONTENIDO

CONTENIDO.....	ix
LISTAS DE FIGURAS	xi
LISTAS DE CUADROS	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Materiales nanoestructurados	3
2.2 Nanopartículas (NPs) metálicas, no metálicas y orgánicas.....	5
2.3 Síntesis de nanopartículas metálicas.....	6
2.4 Efecto de NPs metálicas en seres vivos.....	7
2.5 Efecto de NPs metálicas en plantas.....	8
2.6 Trébol blanco	10
2.7 Hongos micorrízicos arbusculares (HMA).....	11
2.8 Asociación hongo micorrízico-planta en presencia de metales.....	12
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos particulares	15
3.3 Hipótesis general.....	16
3.4 Hipótesis particulares.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1 Biosíntesis de NPs de Ag.....	17
4.2 Caracterización morfológica de NPs de Ag mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).....	17
4.3 Propagación del inóculo del HMA <i>Rhizophagus intraradices</i>	18
4.4 Establecimiento del cultivo hidropónico de trébol con HMA y NPs de Ag.....	18
4.4.1 Tratamientos con inóculo.....	19
4.4.2 Tratamientos sin inóculo	22
4.4.3 Material biológico.....	22
4.5 Evaluación de la colonización micorrízica arbuscular en <i>Trifolium repens</i>	23
4.6 Conteo de esporas en el sustrato	23
4.7 Biomasa fresca y seca y área foliar	24
4.8 Fluorescencia de la clorofila	24
4.9 Estructura radical con microscopía de luz y electrónica de barrido (MEB).....	25

4.10	Acumulación de Ag en raíz con Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma por Acoplamiento Inductivo (ICP-OES, Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer).....	26
4.11	Diseño experimental y análisis estadístico	26
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1	Biosíntesis de NPs de Ag y análisis con espectrometría Uv Vis	28
5.1	Caracterización morfométrica de NPs Ag con MET	30
5.2	Colonización micorrízica en <i>T. repens</i>	32
5.3	Población de esporas en el sustrato	37
5.4	Biomasa fresca y seca de vástago y raíz.....	39
5.4.1	Biomasa fresca	39
5.4.2	Biomasa seca	42
5.4.3	Área foliar	46
5.5	Fluorescencia de la clorofila	47
5.5.1	Pubescencia de la raíz	58
5.6	Acumulación de Ag en raíz con Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma por Acoplamiento Inductivo (ICP-OES, Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer).....	60
6.	CONCLUSIONES	64
7.	LITERATURA CITADA	65

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. A: Nanopartícula metálica, B: Nanopartícula core-shell, C: Nanopartícula core-shell funcionalizada con moléculas biológicas, D: Dendrimero, E: Nanocápsula de núcleo líquido, F: Nanocápsula con la sustancia activa adsorbida a la pared, G: Nanoesfera con nanodominios, H: Nanoesfera matricial con la sustancia activa dispersa. Imagen tomada de (Zavaleta <i>et al.</i> , 2013).....	4
Figura 2. Morfología de la planta de trébol (<i>Trifolium repens</i> L.). https://iowawhitetail.com/forum/threads/clover.15076/page-32	11
Figura 3. Estructuras micorrízicas arbusculares A) Arbúsculo desarrollado, B) Vesículas, estructuras de almacenamiento de nutrientes (Peterson <i>et al.</i> , 2004).....	12
Figura 4. Vasos de unicel con sustrato sembradas con <i>T. repens</i> tratadas con NPs de Ag.	22
Figura 5. Efecto plasmón de NPs de Ag (UV-Vis) sintetizadas con <i>C. sinensis</i> a 22° C. Volumen de extracto 3 mL con 5 mL de AgNO ₃ 10mM, a los 90 d.	29
Figura 6. Histogramas de la distribución de tamaños de NPs de Ag e índice de redondez sintetizadas con <i>C. sinensis</i> a 22° C. A) Distribución de tamaños de NPs de Ag, B) Índice de redondez calculado como diámetro menor entre diámetro mayor. El inserto corresponde a la media ± error estándar, n=300.	31
Figura 7. Micrografías electrónicas de NPs de Ag sintetizadas con <i>C. sinensis</i> a 22°C. Volumen de extracto 3 mL con 5 mL de AgNO ₃ 10 mM, con Microscopía Electrónica de Transmisión. A) Barra= 200 nm, B y C) Barra= 100 nm, D) Barra= 20 nm.....	32
Figura 8. Colonización micorrízica arbuscular del (HMA) <i>Rhizophagus intraradices</i> en las raíces de <i>T. repens</i> en presencia de NPs de Ag. A) 0 µg mL ⁻¹ ; B) 1 µg mL ⁻¹ ; C) 10 µg mL ⁻¹ ; D) 100 µg mL ⁻¹ . A-B, barra=100µm; C-D, barra=75µm.	36
Figura 9. Efecto de las NPs de Ag en el número de esporas en 10 g de sustrato (después de 150 d). Media ± error estándar, n=7. Letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (Tukey, p≤0.05).....	38
Figura 10. Efecto de la presencia de NPs de Ag en el Rendimiento fotoquímico máximo del PSII de <i>Trifolium repens</i> . Media ± error estándar, n=5. Letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (Tukey, p≤0.05). Significancia factor HMA= 0.0033, factor NPs de Ag= 0.0001 e interacción HMA-NPsAg = 0.0001. Se encontró interacción entre HMA-NPsAg, por lo que se fijó el factor inoculación y se comparó con cada nivel de concentración.	49

Figura 11. Anatomía transversal de la raíz secundaria de <i>Trifolium repens</i> sin presencia de NPs de Ag, teñidas con azul de metileno y Azure. A-B con <i>Rhizophagus intraradices</i> (HMA); C-D sin hongo (SHMA); A-C barra= 200 μm ; B-D barra=100 μm . pe = peridermis, cx = corteza, c = cambium vascular x = xilema secundario, ph = floema secundario, r = radio, is = espacio intercelular y f = fibras.	51
Figura 12. Anatomía transversal de la raíz secundaria de <i>Trifolium repens</i> en presencia de NPs de Ag ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), teñidas con azul de metileno y Azure. A-B con <i>Rhizophagus intraradices</i> (HMA); C-D sin hongo (SHMA); A-C barra= 200 μm ; B-D barra=100 μm . pe = peridermis, cx = corteza, c = cambium vascular x = xilema secundario, ph = floema secundario, r = radio, is = espacio intercelular y f = fibras.	52
Figura 13. Anatomía transversal de la raíz secundaria de <i>Trifolium repens</i> en presencia de NPs de Ag ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), teñidas con azul de metileno y Azure. A-B con <i>Rhizophagus intraradices</i> (HMA); C-D sin hongo (SHMA); A-C barra= 200 μm ; B-D barra=100 μm . pe = peridermis, cx = corteza, c = cambium vascular x = xilema secundario, ph = floema secundario, r = radio, is = espacio intercelular y f = fibras.	53
Figura 14. Anatomía transversal de la raíz secundaria de <i>Trifolium repens</i> en presencia de NPs de Ag ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), teñidas con azul de metileno y Azure. A-B con <i>Rhizophagus intraradices</i> (HMA); C-D sin hongo (SHMA); A-C barra= 200 μm ; B-D barra=100 μm . pe = peridermis, cx = corteza, c = cambium vascular x = xilema secundario, ph = floema secundario, r = radio, is = espacio intercelular y f = fibras.	54
Figura 15. Efecto de las NPs de Ag en la pubescencia de raíz de <i>Trifolium repens</i> en la zona pilífera adyacente a la zona de diferenciación, en presencia de hongo micorrízico arbuscular(A-D) y sin hongo (E-H). Concentraciones de NPs Ag: $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A y E); $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (B y F); $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (C y G); $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (D y H).	59
Figura 16. Efecto de las NPs de Ag en la concentración de plata presente en el tejido radical de <i>Trifolium repens</i> inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> (HMA), Media \pm error estándar, n=3. Letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). Significancia: Factor HMA= 0.0489, factor NPs de Ag=0.0001, e interacción HMA-NPsAg=0.0413. Se encontró interacción entre HMA-NPsAg en el diámetro de vasos, por lo que se fijó el factor inoculación y se comparó con cada nivel de concentración	62

LISTAS DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos del diseño experimental factorial 2x4 completamente al azar.....	19
Cuadro 2. Constitución de la solución Long Ashton modificada	21
Cuadro 3. Efecto de las NPs de Ag en el porcentaje de colonización micorrízica arbuscular y estructuras micorrízicas de <i>Rhizophagus intraradices</i> en las raíces de la planta de <i>Trifolium repens</i>	33
Cuadro 4. Efecto de la presencia de NP de Ag en la biomasa fresca de vástago (BFV) y biomasa fresca de raíz (BFR) de <i>T. repens</i> , 90 d después de la inoculación con <i>Rhizophagus intraradices</i>	41
Cuadro 5. Efecto de la presencia de NPs de Ag en la biomasa seca de vástago (BSV) y biomasa seca de raíz (BSR) de <i>T. repens</i> , 90 d después de la inoculación con <i>Rhizophagus intraradices</i>	45
Cuadro 6. Efecto de las NPs de Ag en el área foliar de <i>Trifolium repens</i> , inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i>	47
Cuadro 7. Efecto de la presencia de NPs de Ag en el diámetro de la raíz, diámetro del cilindro vascular y diámetro de la corteza secundaria de <i>Trifolium repens</i> en corte transversal inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> (HMA).....	55
Cuadro 8. Efecto de la presencia de NPs de Ag en el área relativa (%) de espacios intercelulares, en corte transversal de la corteza secundaria de la raíz de <i>T. repens</i> , inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i>	56
Cuadro 9. Efecto de la presencia de NPs de Ag en el número y diámetro de vasos del xilema secundario de la raíz de <i>T. repens</i> , inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> (HMA).....	57

1. INTRODUCCIÓN

Un nanomaterial se define como “un material natural, secundario o fabricado en el que alguna de sus dimensiones está comprendida entre 1-100 nanómetros (nm)” entendiéndose nanómetro a la millonésima parte de un milímetro. El término nanopartícula (NP) refiere a una partícula que posee las tres dimensiones menores de 100 nm y de forma aproximadamente isodiamétrica. La nanotecnología ha diseñado y preparado nuevos nanomateriales que se utilizan en el ámbito médico, farmacéutico, textil, alimenticio, electrónico, plástico y en la mejora del ambiente, entre otros. La demanda de productos basados en la nanotecnología ha aumentado en los últimos años, particularmente en la fabricación de electrónicos, cosméticos y materiales con propiedades ópticas y magnéticas. Aunado a los beneficios del uso de nanopartículas (NPs), prevalece el debate sobre los efectos secundarios al ser desechados al ambiente, ya que éstas pueden ser muy reactivas y pueden tener efectos dañinos sobre los seres vivos; células y tejidos de vegetales, animales y humanos, debido a su tamaño. La evaluación del posible impacto de las nanopartículas es de gran interés y un aspecto aún en desarrollo.

En estudios previos sobre los efectos de NPs de Ag en cultivos agrícolas, se encontró que estos nanomateriales reducen la germinación de las semillas de pepino (*Cucumis sativus* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), y cebada (*Hordeum secale* L), así como la biomasa y la transpiración de calabaza (*Cucurbita pepo* L) y disminuía el crecimiento en plántulas de frijol (*Phaseolus radiatus* L.) y sorgo (*Sorghum bicolor* L.).

Si bien se han realizado algunos trabajos sobre los efectos de las NPs de Ag en algunos cultivos de interés agrícola, poco se ha estudiado sobre el efecto positivo o negativo de las NPs cuando la especie vegetal se encuentra asociada con un simbiote, además de no estar bien documentado el establecimiento de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en los suelos,

en presencia de NPs de Ag. Los hongos micorrízicos arbusculares (*Phylum Glomeromycota*) son microorganismos de la rizósfera que forman una simbiosis del tipo mutualista con el sistema radical de las plantas terrestres. La micorriza arbuscular, contribuye a la mejora de la estructura del suelo mediante la agregación de partículas, el aumento de los procesos de absorción y translocación de los nutrientes P, N, K, Ca, Mg, Zn, Cu, Mo y B, con lo que favorecen el desarrollo de los hospederos, brindándoles mayor tolerancia al estrés hídrico y nutrimental. Algunos estudios señalan a los HMA como importantes protagonistas en la tolerancia a metales pesados y NPs.

El trébol blanco (*Trifolium repens* L.) es una planta que pertenece a la familia Fabaceae; es considerada la segunda leguminosa forrajera más cultivada después de la alfalfa en México y el mundo, considerada de gran valor por la adaptación a un amplio rango climático, alta calidad nutritiva y digestibilidad como forraje. Además, esta especie hospeda bacterias del género *Rhizobium* que realizan la fijación de nitrógeno atmosférico. Por lo que la hipótesis planteada fue: La presencia de las NPs Ag afectará el establecimiento de la simbiosis entre *Rhizophagus intraradices* y la raíz de *Trifolium repens* L.

Con base en lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo contribuir al conocimiento del efecto de NPs de Ag, producidas por biosíntesis con extracto vegetal, en el establecimiento de la simbiosis entre el hongo micorrízico arbuscular *Rhizophagus intraradices* y *Trifolium repens* L.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Materiales nanoestructurados

Los nanomateriales se usan actualmente en centenares de aplicaciones y productos de consumo, que van desde la pasta de dental, hasta las baterías, pinturas o prendas de vestir (Díaz del Castillo, 2012).

La nanociencia es una disciplina enfocada al estudio y caracterización de materiales y moléculas naturales y artificiales en la escala nanométrica (1-100 nm). Un material nanoestructurado es aquel cuyo tamaño es intermedio entre las estructuras moleculares y micrométricas con magnitudes en escala nanométrica (Hernando-Grande, 2007).

Los nanoestructurados de formas esféricas e isodiamétricas pueden agruparse en seis familias:

- **Nanoesferas y nanotubos carbono.** Están formados sólo de átomos de carbono con un arreglo en panal (hexágonos y pentágonos) y reciben el nombre de fullerenos; son muy ligeros, poseen alta dureza, elasticidad y conductividad eléctrica (Cerpa *et al.*, 2013).
- **Nanopartículas sólidas.** Pueden estar formadas de un solo elemento, como oro o plata (Au y Ag), o de algún compuesto reactivo (TiO_2 , AlO_2 , Fe_3O_4 , Ca_2PO_4) (Figura 1 A).
- **Nanopartículas core-shell.** Son partículas que poseen un núcleo con propiedades físicas o químicas diferentes a la cubierta. Éstas pueden funcionalizarse con moléculas biológicas (Figura 1 B y C).
- **Dendrimeros.** Polímeros con numerosas ramas de dimensiones nanométricas, con funciones químicas específicas (Blanco *et al.*, 2011) (Figura 1 D).

- **Nanocápsulas.** Reservorio o cápsula polimérica, conteniendo el principio o material activo en un núcleo sólido, líquido o bien adsorbido en la pared polimérica de la nanocápsula (Figura 1 E, F).
- **Nanoesferas.** Esferas matriciales formadas por macromoléculas naturales, lípidos o polímeros sintéticos, cuyo principio activo se encuentra disperso en la matriz. La matriz puede albergar nano dominios (Blanco *et al.*, 2011) (Figura 1 G, H)

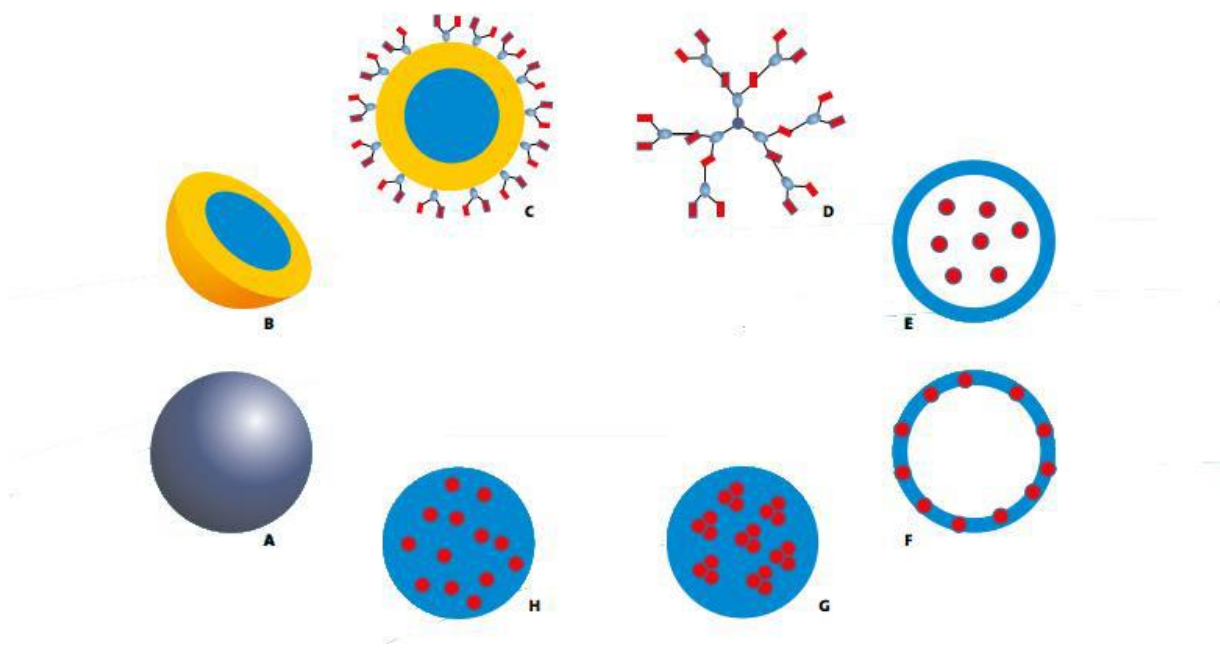


Figura 1. A: Nanopartícula metálica, B: Nanopartícula core-shell, C: Nanopartícula core-shell funcionalizada con moléculas biológicas, D: Dendrimer, E: Nanocápsula de núcleo líquido, F: Nanocápsula con la sustancia activa adsorbida a la pared, G: Nanoesfera con nanodominios, H: Nanoesfera matricial con la sustancia activa dispersa. Imagen tomada de (Zavaleta *et al.*, 2013)

Del conocimiento de los nanoestructurados derivó la nanotecnología, cuyo objetivo es la manipulación de la materia a escala nano, para el diseño, desarrollo y fabricación de nanomateriales de propiedades únicas de aplicación en la electrónica, farmacéutica, medicina, mecánica, aeronáutica, semiconductores, y otros (Carrillo-González *et al.*, 2013).

Actualmente se sigue ampliando el uso y aplicación en diversos campos. Esta nueva ciencia proporciona productos con nuevas propiedades fisicoquímicas, ópticas y magnéticas, diferentes a las de las moléculas individuales de los materiales originales (Medina *et al.*, 2007).

2.2 Nanopartículas (NPs) metálicas, no metálicas y orgánicas

Las nanopartículas se clasifican como NPs inorgánicas y NPs orgánicas. Las NPs inorgánicas incluyen metales y óxidos metálicos (Loomba y Scarabelli, 2013). Ciertos ejemplos de nanopartículas de óxido metálico son la plata (Ag), óxido de hierro (Fe_3O_4), óxido de titanio (TiO_2), óxido de cobre (CuO) y óxido de zinc (ZnO).

Las nanopartículas metálicas han fascinado a los científicos durante más de un siglo y ahora se utilizan en gran medida en ciencias biomédicas e ingeniería. Son un foco de interés debido a su enorme potencial en nanotecnología. Hoy en día, estos materiales se pueden sintetizar y modificar con varios grupos químicos funcionales que les permiten conjugarse con anticuerpos, ligandos y fármacos de interés (Mody *et al.*, 2010).

Las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro, plata, plomo y platino surgen de la oscilación resonante de sus electrones libres en presencia de luz, también conocida como resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) y son características únicas de las mismas (Kumar *et al.*, 2018).

La composición química y la forma de una nanopartícula también influyen en sus propiedades específicas. Las nanopartículas se preparan con polímeros orgánicos (nanopartículas orgánicas)

y/o elementos inorgánicos (nanopartículas inorgánicas). Liposomas, dendrímeros, nanomateriales de carbono y micelas poliméricas son ejemplos de nanopartículas orgánicas.

2.3 Síntesis de nanopartículas metálicas

La obtención de nanopartículas metálicas estables en solución ha sido un área muy activa de investigación. Las más comúnmente sintetizadas y estudiadas son las de metales nobles: oro, plata, platino y paladio fundamentalmente (Díaz del Castillo, 2012).

La preparación de nanopartículas metálicas cobró recientemente gran interés debido a las particularidades de sus propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas y catalíticas. Muchas de estas propiedades y sus posibles aplicaciones son fuertemente influenciadas por el tamaño y la forma de las mismas. Es por eso que en los últimos tiempos se desarrollaron distintas técnicas de preparación de nanopartículas; éstas incluyen métodos físicos y químicos: “nanosphere lithography” (NSL) preparación en fase vapor, evolución fotoinducida, reducción electroquímica, reducción química en medio continuo y micelar, etc. (Díaz del Castillo, 2012).

La síntesis de las nanopartículas metálicas además de realizarse mediante diversos métodos físicos y químicos, existen los métodos biológicos, son métodos relativamente simples, rentables, no tóxicos y respetuosos con el medio ambiente (Tran *et al.*, 2013), los primeros usan reactivos tóxicos que deterioran el ambiente. Los métodos para biosíntesis de partículas metálicas de plata usan extractos vegetales provenientes de *Citrus sinensis*, *Gardenia jasminoides* Ellis, *Brassica juncea* L. Coss., *Medicago sativa* L., *Helianthus annuus* L., entre otros como *Camellia sinensis* L. Kuntze. y *Chenopodium ambrosioides* L. (Carrillo-López *et al.*, 2014) como una alternativa no tóxica. La síntesis de NP que utilizan plantas es muy rentable y, por lo tanto, se puede utilizar como una alternativa económica y valiosa para la producción a gran escala de NP (Iravani, 2011).

La biosíntesis de NPs metálicas mediada a través de extractos de plantas se realiza en tres pasos diferentes. El primer paso (fase de inducción) es una rápida reducción de iones y la nucleación de semillas metálicas. Tales cristales pequeños, reactivos e inestables se agregan espontáneamente y se transforman en grandes agregados (fase de crecimiento). Cuando los tamaños y formas de los agregados se vuelven energéticamente favorables, algunas biomoléculas actúan como agentes de recubrimiento que estabilizan las nanopartículas (fase de terminación) (Marchiol *et al.*, 2014).

El extracto de *Camellia sinensis* (té verde) se ha utilizado como agente reductor y estabilizador para la biosíntesis de los NP de plata (Vilchis-Nestor *et al.*, 2008). Las biomoléculas de tipo ácido fenólico (cafeína y teofilina) presentes en el extracto de *C. sinensis* parecen ser responsables de la formación y estabilización de los NP de plata.

El método que se desarrolla en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo produce nanopartículas de Ag, de tamaños uniformes, en una solución que las mantiene estables por más de 18 meses, además de ser un método muy económico de gran potencial tecnológico (Carrillo-López *et al.*, 2014; Vicencio-Salas *et al.*, 2018).

2.4 Efecto de NPs metálicas en seres vivos

Se estima que de todos los nanomateriales utilizados en productos para el consumo humano, las nanopartículas de plata (NPs Ag) son las que tienen un mayor grado de comercialización; estas NPs se utilizan en electrónica, ropa, pinturas, cosméticos, bactericidas, biofungicidas, aplicaciones biomédicas, en la industria médico-farmacéutica y alimentaria (Ávalos *et al.*, 2013).

La función fitotóxica de NPs de TiO₂, CeO₂, Fe₃O₄, and ZnO, Au, Ag, Cu y Fe se ha investigado con resultados polémicos, por lo que la absorción, bioacumulación, biotransformación y riesgos de nanomateriales en cultivos destinados a la alimentación no es bien conocida (Rico *et al.*, 2011).

Investigaciones previas sugieren que existen diversas propiedades físico-químicas de las NPs Ag que están involucradas en su toxicidad intrínseca, como son el tamaño, la superficie específica, estado de aglomeración, la forma, la solubilidad y la carga superficial (Choi y Hu, 2008). El tamaño y la superficie específica de las NPs están en estrecha relación, ya que conforme disminuye el tamaño de las NPs Ag la superficie específica aumenta dejando un mayor número de átomos expuestos en la superficie (Hernando-Grande, 2007) que estarán disponibles para las reacciones redox, reacciones fotoquímicas y para interacciones físico-químicas con las células. Además, debe considerarse que las NPs pueden liberar iones plata (Ag⁺), en condiciones específicas y ser potencialmente tóxicos.

2.5 Efecto de NPs metálicas en plantas

Las NPs de Ag ejercen efectos visibles de reducción en la germinación de semillas de pepino (*Cucumis sativus* L.) y lechuga (*Lactuca sativa* L.), pero no se observó un efecto de toxicidad (Barrena *et al.*, 2009). Dentro de los efectos demostrados del efecto de NPs de Ag en cultivos se encuentra: la reducción de la germinación de la cebada (*Hordeum secale* L.); también se ha demostrado reducción de la biomasa y la transpiración de *Cucurbita pepo* L; reducción del

crecimiento de plántulas de las especies *Phaseolus radiatus* L. y *Sorghum bicolor* L (Lee *et al.*, 2012)

En otros estudios se reporta el efecto de NPs Ag en la longitud de brotes y raíces de trigo (*Triticum aestivum* L.). Aplicaciones de 2.5 mg kg^{-1} de las NPs aumentaron la ramificación en las raíces de trigo, afectando la biomasa vegetal (Dimkpa *et al.*, 2013). Los niveles más altos de iones Ag (2.5 mg kg^{-1}) redujeron el crecimiento, similar a los efectos de NPs de Ag. En este estudio se detectó acumulación de Ag en los brotes, indicando una captación y transporte del metal de los NPs de Ag hacia la parte aérea y estrés oxidativo en las raíces, este estudio demuestra el efecto de las NPs Ag sobre el metabolismo y crecimiento en un cultivo alimentario (Dimkpa *et al.*, 2012).

Una de las herramientas para saber si las plantas se encuentran bajo estrés en el aparato fotosintético, en este caso bajo estrés de NPs de Ag es midiendo la fluorescencia de la clorofila *a*. El análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II permite caracterizar los efectos de diferentes tipos de estrés (temperatura, sequía, alta intensidad luminosa, salinidad, inundación) y diversos contaminantes del agua y suelo como metales pesados en la eficiencia fotosintética (González *et al.*, 2008).

La energía luminosa absorbida por las moléculas de clorofila puede conducirse por diferentes vías (a) conducir a la fotosíntesis; (b) ser remitido como calor; o (c) remitirse como luz (fluorescencia) (Maxwell y Johnson, 2000). Estos tres procesos no existen de forma aislada, sino que compiten entre sí. Por lo tanto, el rendimiento de la emisión de fluorescencia de clorofila nos brinda información sobre la eficiencia cuántica de la fotoquímica y la disipación de calor (Murchie y Lawson, 2013).

De esta manera, al disminuir la Fv/Fm significa un posible estrés sobre el aparato fotosintético (Baker, 2008). Valores alrededor de 0.65 se han sugerido como indicativos de células sanas en algunos taxones de microalgas (Wang *et al.*, 2014); eficiencias inferiores indicarían estrés.

2.6 Trébol blanco

El trébol blanco (*Trifolium repens* L.) es una leguminosa que pertenece a la familia Fabaceae, es una hierba perenne, altura promedio de 20 cm, posee tallo rastrero, con hojas trifoliadas alternadas; anchamente elíptico-ovados de 1 a 3 cm de largo; glabras; con una mancha blanquecina en el centro, con el peciolo de 5-25 cm de largo (Rzedowski, 2001). Su inflorescencia es una umbela globosa, densa, de 1-2 cm de diámetro, con pedúnculos más largos que las hojas; pedicelos de 1-6 cm de largo, corola blanca o rosada. Los frutos son vainas de 4-5 cm y con 3-4 semillas. El trébol blanco se extiende por estolones rastreros, con raíces y nudos que forman nuevas plantas.

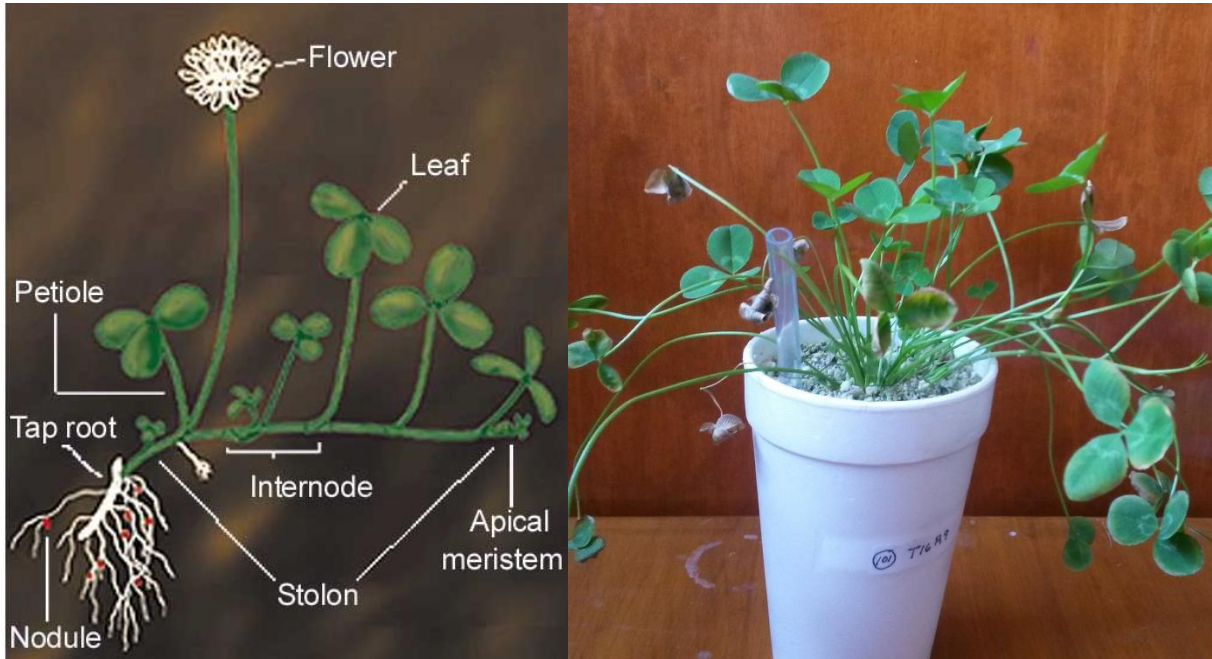


Figura 2. Morfología de la planta de trébol (*Trifolium repens* L.).

<https://iowawhitetail.com/forum/threads/clover.15076/page-32>

2.7 Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

La rizósfera es un ambiente extremadamente activo, los microorganismos rizosféricos pueden contribuir al crecimiento y salud de las plantas (Kaye *et al.*, 2005). Los microorganismos del suelo son componentes indispensables del ecosistema del suelo y desempeñan un papel crucial en la transformación y degradación de una amplia variedad de contaminantes, manteniendo así la productividad del suelo y las funciones ecológicas (Siani *et al.*, 2017).

Por ejemplo, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microorganismos ubicuos del suelo que pueden establecer una interacción simbiótica, las hifas de los HMA se asocian con las raíces del 70-90 % de las plantas terrestres (Parniske, 2008; Smith y Read, 2008) y forman la micorriza arbuscular. Estos organismos pertenecen al Phylum Glomeromycota se caracterizan por no presentar reproducción sexual y ser simbioses obligados de las plantas terrestres. Los

HMA son conocidos por su papel benéfico en el aumento en la adquisición de nutrientes de las plantas, especialmente fósforo (P), y resistencia de la planta a tensiones externas (Miransari, 2010). Además de los efectos directos en sus hospedantes, los HMA pueden aumentar las actividades enzimáticas del suelo porque sus propágulos pueden sintetizar las enzimas y sus raíces hospedadoras pueden liberar enzimas que son importantes para el ciclo de nutrientes en los suelos (Rillig, 2004; Wang *et al.*, 2006).

También esta asociación mutualista confiere a las plantas hospederas un aumento en la tolerancia al estrés hídrico, ya que esta interacción optimiza la asimilación de nutrimentos y agua (Ruiz-Lozano *et al.*, 1995). Además, se ha reportado la contribución de los HMA en la agregación del suelo, contribuyendo a mejorar la estructura edáfica (González-Chávez *et al.*, 2004a), evitando la erosión del suelo, la lixiviación de los nutrimentos, y a su vez los agregados contribuyen a formar reservas de los nutrimentos atrapados en estas estructuras.

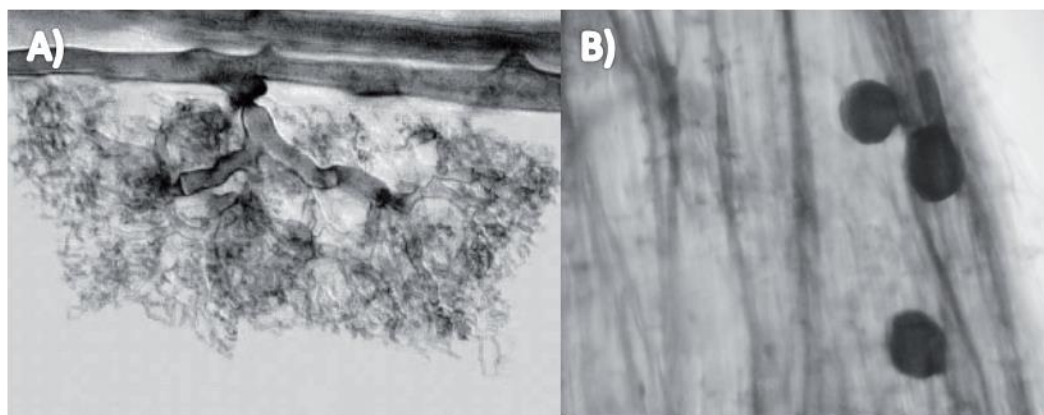


Figura 3. Estructuras micorrízicas arbusculares A) Arbúsculo desarrollado, B) Vesículas, estructuras de almacenamiento de nutrientes (Peterson *et al.*, 2004).

2.8 Asociación hongo micorrízico-planta en presencia de metales

Los HMA pueden tolerar condiciones ambientales extremas, incluidos los factores de estrés causados por los metales pesados en los suelos (Wu *et al.*, 2010). Si bien se han reportado

algunos efectos negativos de las NPs sobre los HMA a altas concentraciones también se ha demostrado que los HMA juegan un papel clave en la tolerancia, secuestro, incluida su acumulación. Se ha demostrado que el uso de productos a base de HMA desempeña un papel muy importante en la agricultura por su efecto benéfico sobre las plantas y los ecosistemas. (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2016). Estos microorganismos participan en la translocación de nutrientes presentes en el suelo fundamentalmente el fósforo y en la capacidad de aumentar la tolerancia de las plantas a los diferentes estreses tanto bióticos como abióticos. Aunque la toxicidad de las NPs metálicas se ha evaluado para una variedad de organismos, incluidas las plantas, existen pocos estudios que incluyen el análisis simultáneo de cómo las NPs de Ag afectan el crecimiento de la planta y la comunidad microbiana en suelos rizosféricos (Sillen *et al.*, 2015). Por lo cual es pobre el entendimiento sobre las interacciones potenciales de las comunidades microbianas, que están de manera natural en plantas en presencia de nanopartículas (Feng *et al.*, 2013)

Algunos estudios de la respuesta de la aplicación de NPs de Ag en haba (*Vicia faba* L.) e inoculada con *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*- *Glomus aggregatum*, indicó que las NPs en presencia del hongo disminuían la germinación en un 40%. Se demostró que las NPs de Ag retardaban la actividad nitrogenasa, la respuesta y colonización micorrízica, y contenido de glomalina (Abd-Alla *et al.*, 2016)

Investigaciones recientes, las cuales involucran la influencia de los HMA en plantas como en fenogreco (*Trigonella foenum-graecum*), resaltan el rol protector del hongo en la rizósfera de la planta a través de la secreción de glomalina un potente quelante de metales, reduciendo así la nanotoxicidad y mejorando el crecimiento y desarrollo de la planta bajo

crecientes concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO NPs) (0, 125, 250, 375 y 500 $\mu\text{g g}^{-1}$) (Siani *et al.*, 2017)

Debido a la función vital de los HMA en los ecosistemas del suelo y teniendo en cuenta el conocimiento de los efectos de las NPs de Ag en las plantas es importante evaluar las consecuencias de la introducción de NPs de Ag en el ecosistema del suelo, para conocer el efecto en el establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular y las interacciones hongos-planta.

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de nanopartículas de plata (NPs de Ag), producidas por biosíntesis con extracto vegetal, en el establecimiento de la simbiosis entre el hongo micorrízico arbuscular *Rhizophagus intraradices* y *Trifolium repens* L.

3.2 Objetivos particulares

- Biosintetizar NP de Ag con extracto vegetal y caracterizar el efecto plasmón superficial, la forma y tamaño.
- Evaluar el efecto de NPs de Ag en el porcentaje de colonización de HMA de la raíz de *T. repens* y número de esporas presentes en el sustrato contaminado.
- Estudiar la estructura interna y externa de la raíz de *T. repens* inoculadas con HMA, en presencia de NPs de Ag.
- Estudiar la acumulación de Ag en el tejido radical de *T. repens* mediante ICP-OES.

3.3 Hipótesis general

- ❖ La presencia de las NPs Ag afecta el establecimiento de la simbiosis entre *Rhizophagus intraradices* y la raíz de *Trifolium repens* L.

3.4 Hipótesis particulares

- ❖ El porcentaje de colonización de *Rhizophagus intraradices* y número de esporas disminuye con el aumento de la concentración de NPs de Ag.
- ❖ La estructura interna y externa de la raíz de trébol blanco se modifica por la exposición a NPs de Ag, pero el efecto es menor en las plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices*.
- ❖ La acumulación de Ag en el tejido radical de *Trifolium repens* L. se reduce por la presencia de HMA.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Biosíntesis de NPs de Ag

Las NPs de Ag fueron biosintetizadas siguiendo el protocolo sugerido por Vicencio-Salas *et al.* (2018), nitrato de plata (AgNO_3) 10 mM y 3 mL de extracto de *Camellia sinensis*. La preparación del extracto acuoso consistió en vaciar 2 g de té verde (Therbal[®]) en 100 mL de agua desionizada a 95°C, dejar hervir durante 5 min y enfriar a temperatura ambiente. Después el extracto fue filtrado en papel Whatman No. 1 y 4. La solución de AgNO_3 10 mM fue preparada con 16.9 mg de AgNO_3 Sigma Aldrich de México (Silver nitrate, ACS \geq 99.0 %) y aforado a 100 mL con agua desionizada.

A 83.33 mL de solución de AgNO_3 se le adicionó 50 mL de extracto vegetal y fue aforado a 250 mL con agua desionizada. La solución fue expuesta a la radiación solar por 5 min.

Para corroborar la formación de NPs de Ag en el extracto acuoso, se obtuvieron los espectros de absorción en el rango de 350-700 nm, con un espectrofotómetro UV-Vis (Hewlett Packard HP 8453 UV-Vis). Los datos se graficaron, para confirmar la aparición del plasmón superficial, típico de la NPs de Ag (Carrillo-López *et al.*, 2014), a los 90 d de síntesis.

4.2 Caracterización morfométrica de NPs de Ag mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

La solución original de síntesis con las NPs de Ag fue diluida 6:1 en agua desionizada y luego fue sonicada durante 10 min. Una gota (10 μ l) de la dilución se colocó sobre una rejilla de cobre de malla 300 para MET (Rejillas Lacey Formvar/Carbon), posteriormente fueron observadas con la técnica de Campo Claro (Bright Field, BF), en el Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) modelo TECNAI F30 (FEI-Thermofisher, USA) a 300 Kv en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) del Instituto Potosino

de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). A un total de 300 NPs de Ag, de 8 micrografías, se midió el diámetro mayor y diámetro menor y se calculó el índice de redondez (IR= diámetro menor/diámetro mayor) con el programa UTHSCSA ImageTool (Ver. 2.0, US, 1997).

4.3 Propagación del inóculo del HMA *Rhizophagus intraradices*

Para la propagación del hongo se utilizó una mezcla de suelo-tezontle (1:1) esterilizado en olla de presión a 15 lb de presión durante 3 h por 3 d intercalados (un día sí, un día no) y vaciado en dos contenedores de 1L, posteriormente, una capa del inóculo de *Rhizophagus intraradices*, proveniente de plantas de papaya (*Carica papaya* L.), fue vertida, y finalmente otra capa de la mezcla suelo-tezontle esterilizado. Las mismas plantas de papaya fueron trasplantadas. El ciclo de propagación tuvo una duración de 6 meses. Con la finalidad de evaluar la viabilidad del inóculo, de los dos contenedores, se obtuvieron 4 muestras de suelo, para contar el número de esporas y 4 muestras de raíz para determinar el porcentaje de colonización, a los 5 meses de propagación.

4.4 Establecimiento del cultivo hidropónico de trébol con HMA y NPs de Ag

El sustrato del cultivo hidropónico fue arena:perlita (1:1). La arena (arena de río) fue lavada con agua corriente, secada a temperatura ambiente y esterilizada en una olla de presión a 15 lb, 3 h cada tercer día por una semana. Después la arena se mezcló con perlita estéril (Agrolita) en proporción 1:1. La ausencia de hongo micorrízico arbuscular se denominó como “sin HMA” (SHMA o -HMA). Los tratamientos se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos del diseño experimental factorial 2x4 completamente al azar.

Tratamiento	Sustrato	Inoculación	Concentración NPs Ag ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Testigo
1	Sustrato	+HMA	0	Testigo
2	Sustrato	+HMA	1	
3	Sustrato	+HMA	10	
4	Sustrato	+HMA	100	
5	Sustrato	-HMA	0	Testigo
6	Sustrato	-HMA	1	
7	Sustrato	-HMA	10	
8	Sustrato	-HMA	100	

4.4.1 Tratamientos con inóculo

El sustrato + HMA se preparó agregando 10g de inóculo de *R. intraradices* por cada 400 g de sustrato, posteriormente la mezcla se colocó en vasos de unicel de 500 g de capacidad, a los cuales se les agregó la concentración de NPs de Ag (0, 1.0, 10.0 y 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), y cada tratamiento consistió de 7 repeticiones.

Con la finalidad de no acarrear las nanopartículas al fondo del contenedor, por riego superficial, en cada contenedor, una manguera plástica de 0.5 cm de diámetro y 13 cm de longitud, se colocó a la pared del recipiente (Figura 4) donde se aplicó cuidadosamente el riego (30 mL) cada tercer día con agua destilada y semanalmente 50 mL de solución nutritiva Long Ashton deficiente en P (7-8 ppm) Cuadro 2 (Hewitt, 1996).

Cuadro 2. Constitución de la solución Long Ashton modificada.

Solución “stock”	Cantidad de reactivo en peso (g L⁻¹)	Cantidad de solución stock para preparar 1L (mL)
KNO ₃	80.8	5.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	73.6	5.0
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	188.8	5.0
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	36.8	1.25 para 10.25 µg mL ⁻¹ 2.50 para 20.50 µg mL ⁻¹ 5.00 para 41.00 µg mL ⁻¹
Elementos traza		1.00
Solución de citratos (Adicionar antes de la fertilización)		5.00
Solución “stock” elementos traza		
		<ul style="list-style-type: none"> • Aforar a 1000 ml con agua destilada
MnSO ₄ H ₂ O	1.69	
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.25	
ZnSO ₄ H ₂ O	0.29	
H ₃ BO ₃	3.10	
NaCl	5.90	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4 H ₂ O	0.088	
Solución “stock” de citratos:		
		<ul style="list-style-type: none"> • Aforar a 1000 ML con agua desionizada destilada • Agitar por unos min y llevar a autoclave para completa la disolución • Almacenar en refrigeración
Citrato férrico (FE ₆ C ₆ H ₅ O ₇)	4.9	
Ácido cítrico (H ₃ C ₆ H ₅ O ₇ H ₂ O)	4.9	

4.4.2 Tratamientos sin inóculo

Estos tratamientos se prepararon de la manera como se describe en la sección anterior: 410 g de sustrato y las concentraciones de NPs Ag (0, 1.0, 10.0 y 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y cada tratamiento consistió de 7 repeticiones.

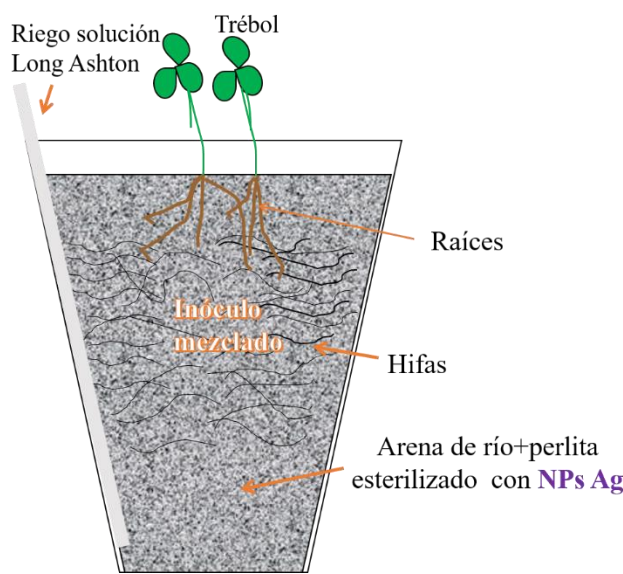


Figura 4. Vasos de unicel con sustrato sembradas con *T. repens* tratadas con NPs de Ag.

4.4.3 Material biológico

Semillas de trébol blanco (*Trifolium repens* L.), provenientes de la central de Abasto de la Ciudad de México, fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (HCl) al 5% durante 10 min y se sembraron 6 semillas por vaso. Una vez que alcanzó la etapa de plántula se eliminaron 4 plantas y se dejaron dos plantas más vigorosas por maceta, las cuales se mantuvieron en condiciones de cámara de crecimiento controlado a 26°C, 80% HR y fotoperíodo de 12 h luz y 12 h oscuridad del Departamento de Botánica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, durante tres meses, tiempo en el que se colonizan las raíces y las plantas se encontraban en inicio de la etapa de reproducción.

4.5 Evaluación de la colonización micorrízica arbuscular en *Trifolium repens*

La evaluación del porcentaje de colonización micorrízica fue determinado por el método de Phillips y Hayman (1970). Una porción de 30 raíces (1.5 cm) del sistema radical de las plantas de trébol se fijó en solución FAA (formol 10%, ácido acético glacial 5 %, alcohol al 96%-50% y agua destilada 35 %). Posteriormente las raíces se sumergieron en hidróxido de potasio (KOH) al 10%, durante tres días para clarear el tejido, después los segmentos igualmente se sumergieron en azul de tripano 0.05% en lactoglicerol durante 20 min para teñir al hongo y por último en lactoglicerol limpio para quitar el exceso de colorante. Por último, veinte segmentos de 1 cm, fueron montados paralelamente con lactoglicerol, por portaobjeto. Las estructuras micorrízicas (hifas, arbusculos y vesículas) por preparación, fueron contadas en un microscopio óptico (Leica® DM500, Suiza) fueron observados 60 campos ópticos con un objetivo de 10X. El porcentaje de colonización total y estructuras micorrízicas se calculó mediante las fórmulas:

$$\text{Porcentaje de colonización total} = \frac{\text{número de segmentos colonizados}}{\text{número de segmentos totales}} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de colonización por vesículas} = \frac{\text{número de segmentos con vesículas}}{\text{número de segmentos totales}} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de colonización por arbusculos} = \frac{\text{número de segmentos con arbusculos}}{\text{número de segmentos totales}} \times 100$$

El porcentaje de colonización por hifas se determinó por diferencia de porcentaje de colonización total menos porcentaje de colonización por vesículas y arbusculos.

4.6 Conteo de esporas en el sustrato

El procedimiento de separación y conteo de esporas en el suelo fue realizado por el método de tamizado y decantación en húmedo (Gerdemann y Nicolson, 1963). Por muestra fueron pesados 10 g de suelo seco y vaciados a un frasco de 1L con agua corriente, la muestra fue agitada vigorosamente durante 2 min y dejada en reposo de 20-30 s, el sobrenadante fue

vertido en 2 tamices de apertura de 100 y 45 μ m, este procedimiento fue repetido tres veces. Después, de acuerdo al método de centrifugación y flotación en sacarosa (Jenkins. 1964), el decantado obtenido con el tamiz de 45 μ m fue vaciado en tubos Falcon de 45 mL con 2 concentraciones de sacarosa (20% y 60%), y centrifugado a 15000 rpm (centrifuga Sigma 2-16P, Alemania) durante 10 min. El sobrenadante obtenido fue vertido a un tamiz pequeño de 45 μ m y lavado con abundante agua destilada para eliminar la sacarosa, y evitar que las esporas sufrieran choque osmótico; la solución restante se colocó en cajas Petri y el número de esporas presentes en 10g de sustrato fue contado con un microscopio estereoscópico (Leica® EZ4D, Suiza).

4.7 Biomasa fresca y seca y área foliar

Después de tres meses de crecimiento, se obtuvo una imagen lateral en RGB de cada planta con la plataforma de fenotipaje Scanalyzer (LemnaTec Scanalyzer PL, Alemania) del laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Botánica. Con el programa UTHSCSA ImageTool (Ver. 2.0, US, 1997) se obtuvo una aproximación del área foliar. Para obtener la biomasa fresca (BF) de vástago y raíces, los órganos fueron pesados en una balanza de precisión (ACCULAB® MCA, U.S.A.). Para obtener la biomasa seca (BS) los órganos fueron colocados en bolsas de papel y secados en una estufa a 70° C durante tres días, hasta obtener peso constante y posteriormente pesados en una balanza de precisión (ACCULAB® MCA, U.S.A.).

4.8 Fluorescencia de la clorofila

Las plantas de *T. repens* se sometieron a obscuridad durante 10 min en una caja de madera tapada completamente. Después por cada unidad experimental se cortó una hoja compuesta al mismo nivel para todas las plantas (hojas centrales) e inmediatamente se midió la fluorescencia de la clorofila *a* con el equipo Fluor Cam P-800 (Phososystem Instrument PSI,

República Checa) del laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Botánica. Se tomaron imágenes con el equipo.

4.9 Estructura radical con microscopía de luz y electrónica de barrido (MEB)

Los cambios estructurales en la raíz se estudiaron en cortes transversales de resina semifinos (1-2 μm), tomados a 4 cm de la base hacia el ápice de la raíz principal. Se cortaron 4 segmentos de raíz y fueron fijadas en una solución de glutaraldehído 3% en amortiguador de fosfatos Sorensen's 0.1 M pH 7.4 según Ruzin (2000). Los tejidos fueron postfijados en tetraóxido de osmio (2%) y deshidratados gradualmente en soluciones de etanol (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%). Los tejidos fueron procesados e incluidos en resina de Spurr, dureza media (Electron Microscopy Sciences). Los cortes (1 μm) fueron obtenidos con un ultra micrótomo (Leica Reichert OMU-3, Wetzlar, Alemania) con microscopio (American Optical, U.S.A), cortados con navajas de vidrio. Los cortes fueron teñidos en una solución de azul de metileno 1% y Azure 1% en bórax. Los cortes fueron observados en un microscopio óptico compuesto Axiostar Plus (Carl Zeiss, Alemania) y fotografiados con una cámara digital Moticam 5 (Motic, Hong Kong, China). En las 4 repeticiones por tratamiento se realizaron mediciones del diámetro de la raíz, diámetro del cilindro vascular, ancho de la corteza, conteo de estratos de peridermis, número de vasos de xilema secundario y diámetro de vasos de xilema secundario, con el programa UTHSCSA ImageTool (Ver. 2.0, US, 1997). En imágenes de los cortes transversales impresos de la raíz fueron identificados los espacios intercelulares, los cuales se cortaron y pesaron en una balanza analítica, así como la raíz completa; de acuerdo al peso obtenido fue calculado el área relativa (%) ocupada por los espacios intercelulares y tejidos.

Segmentos de raíz obtenidos de la zona pilífera apical adyacente a la zona de diferenciación fueron fijados en una solución de glutaraldehído 3% en amortiguador de fosfatos

Sorensen's 0.1 M pH 7.4 según Ruzin (2000). Los tejidos fueron deshidratados gradualmente en soluciones de etanol (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%). Los tejidos fueron secados a punto crítico con CO₂ (Samdri-780A, USA.), y recubiertos en oro/paladio a bajo vacío durante 15 min con una evaporadora (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat, Japón). La abundancia de pelos radicales, se observó en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) (Jeol JSM-6390, Japón) de la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, a 10 Kv.

4.10 Acumulación de Ag en raíz con Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma por Acoplamiento Inductivo (ICP-OES, Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer)

Las plantas fueron separadas por órganos, las raíces fueron lavadas con agua desionizada y secadas en una estufa a 70°C durante 3 días, la materia seca de raíz fue macerado en un molino para plantas y fue pesado 1g de material vegetal. La preparación de la muestra consistió en hacer una digestión ácida, por medio de Agua Regia Inversa (14 mL) y peróxido de hidrógeno (0.5 mL). Para determinar la concentración de Ag, las muestras digeridas fueron analizadas mediante Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma por Acoplamiento Inductivo-ICP-OES (Perkin Elmer óptima 8300, EE. UU.), del Laboratorio de Parámetros Ambientales, de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

4.11 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental empleado fue factorial 2x4 en DECA (diseño experimental completamente al azar), incluyendo 8 tratamientos con 7 repeticiones cada uno. Los factores fueron los siguientes: dos niveles de inoculación (plantas con y sin HMA) y cuatro niveles de NPs de Ag (0, 1, 10, 100 µg mL⁻¹). Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza

de dos vías (ANDEVA, $p \leq 0.05$), En todas las variables excepto número de vasos se encontró interacción, por lo tanto, se hizo la prueba de Tukey-DSH, para el factor inoculación (HMA) (el análisis mantuvo fija la inoculación y se comparó con cada nivel de concentración). Para las variables: colonización micorrízica los datos fueron transformados a arc sen; para el número de esporas a raíz cuadrada, y únicamente fueron analizados con un ANDEVA de una vía, cabe señalar que los datos se presentan en la escala original. Por último, la concentración de plata se transformó a logaritmo. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS v9.4 (Statistical Analysis System, Institute Inc., Cary, NC, USA).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Biosíntesis de NPs de Ag y análisis con espectrometría Uv Vis

En esta investigación fueron utilizadas nanopartículas metálicas (NPs) de plata (Ag) biosintetizadas por el método utilizado por Vicencio-Salas (2017), en el que se usa nitrato de plata (AgNO_3) 10 mM y 3 mL de extracto de *Camellia sinensis*. Esta concentración de plata y volumen de extracto, mostró un plasmón de resonancia superficial característico, absorbancia elevada, indicador de una alta síntesis de nanopartículas y además estabilidad de la solución durante 14 meses. Por lo tanto, fue seleccionada para sintetizar y ser probada en el trabajo experimental.

El cambio de color indicó la formación de NPs de Ag en la solución (Ying *et al.*, 2012) y es debido a la presencia de “resonancia de plasmones superficiales” una característica óptica de las NPs de Ag (Carrillo-López *et al.*, 2014). El cambio de color se detectó mediante observación visual en el matraz Erlenmeyer que contiene solución de AgNO_3 con extracto de té de *C. sinensis*. El color de la solución de extracto de té- AgNO_3 cambió de incoloro a amarillo y finalmente a marrón oscuro en un lapso de 5 min. Los compuestos fitoquímicos presentes en el extracto de las hojas son considerados responsables de la reducción de iones de plata a NPs de Ag (Krishnaraj *et al.*, 2012).

La síntesis de NPs de Ag se corrobora con los espectros de absorción UV-Vis, son ampliamente utilizados para caracterizarlas, estos espectros proporcionan información sobre las propiedades ópticas dependientes del tamaño, la distribución y las propiedades superficiales de las nanopartículas (Ider *et al.*, 2016).

La Figura 5 muestra el espectro de absorción de la solución sintetizada de NPs de Ag, indicando la síntesis de nanopartículas de plata, después de tres meses de haberse sintetizado;

en dicha figura se observa una banda de plasmón superficial, con una absorbancia máxima de 18 u.a. a una λ de 450 nm. Una absorbancia similar la reportaron Loo *et al.* (2012), utilizando el extracto de *C. sinensis* var. *assamica* en la biosíntesis de NPs de Ag, además observaron un amplio pico de absorción a una λ 436 nm, e indican que es una banda característica para la Ag.

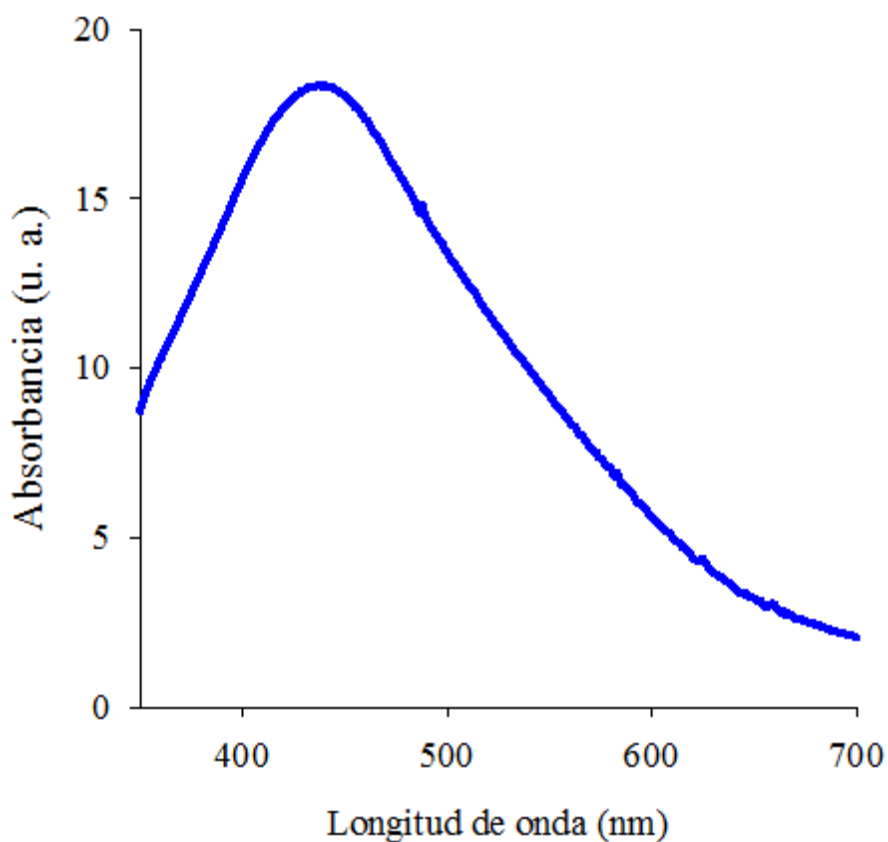


Figura 5. Efecto plasmón de NPs de Ag (UV-Vis) sintetizadas con *C. sinensis* a 22° C. Volumen de extracto 3 mL con 5 mL de AgNO₃ 10mM, a los 90 d.

5.1 Caracterización morfométrica de NPs Ag con MET

Las NPs de Ag fueron partículas con un tamaño de 21.61 ± 0.44 nm y el intervalo de tamaño más frecuente fue de 20-30 nm (Figura 6).

De acuerdo con las observaciones en el MET, en la Figura 7 se observan micrografías electrónicas de las NPs de Ag, sintetizadas con extracto de *C. sinensis*. El índice de redondez calculado como diámetro menor entre diámetro mayor fue (0.85 ± 0.005), valor cercano a uno (1.0), indica una forma cuasi esférica. El tamaño y la forma de las nanopartículas sintetizadas con *C. sinensis* para esta tesis fue similar a las reportadas por Krishnaraj *et al.*, (2012) sintetizadas con el extracto vegetal de *Acalypha indica*, con forma cuasi esféricas a cúbicas, por el contrario con el mismo extracto de *C. sinensis*, Loo *et al.*, (2012), informaron NPs de Ag de menor tamaño (4.06 nm) y el intervalo más frecuente de 2 a 10 nm. Carrillo-López *et al.* (2014) reporta la biosíntesis de NPs de Ag con *Chenopodium ambrosioides* en un intervalo de 4.9-8.5 nm, las cuales son consideradas partículas pequeñas (<10 nm), en contraste las partículas generadas en nuestro estudio con *Camelia sinensis* fueron de mayor tamaño (21 nm).

El tamaño y forma de las NPs sintetizadas con extractos vegetales, es muy variable entre los estudios, debido a la complejidad de la composición de los extractos vegetales y las moléculas que participan en su síntesis. Para el presente estudio el tamaño de las NPs obtenidas fue aceptable y la dispersidad baja, es decir la mayoría de las partículas se encontraron en los rangos de 10-20 nm y 20-30 nm

A pesar de que es conocido que partículas pequeñas tienen mejores propiedades ópticas y catalíticas que las partículas más grandes (Huang *et al.*, 2007), en el presente estudio no se comparó el efecto del tamaño, solo la concentración en las variables analizadas.

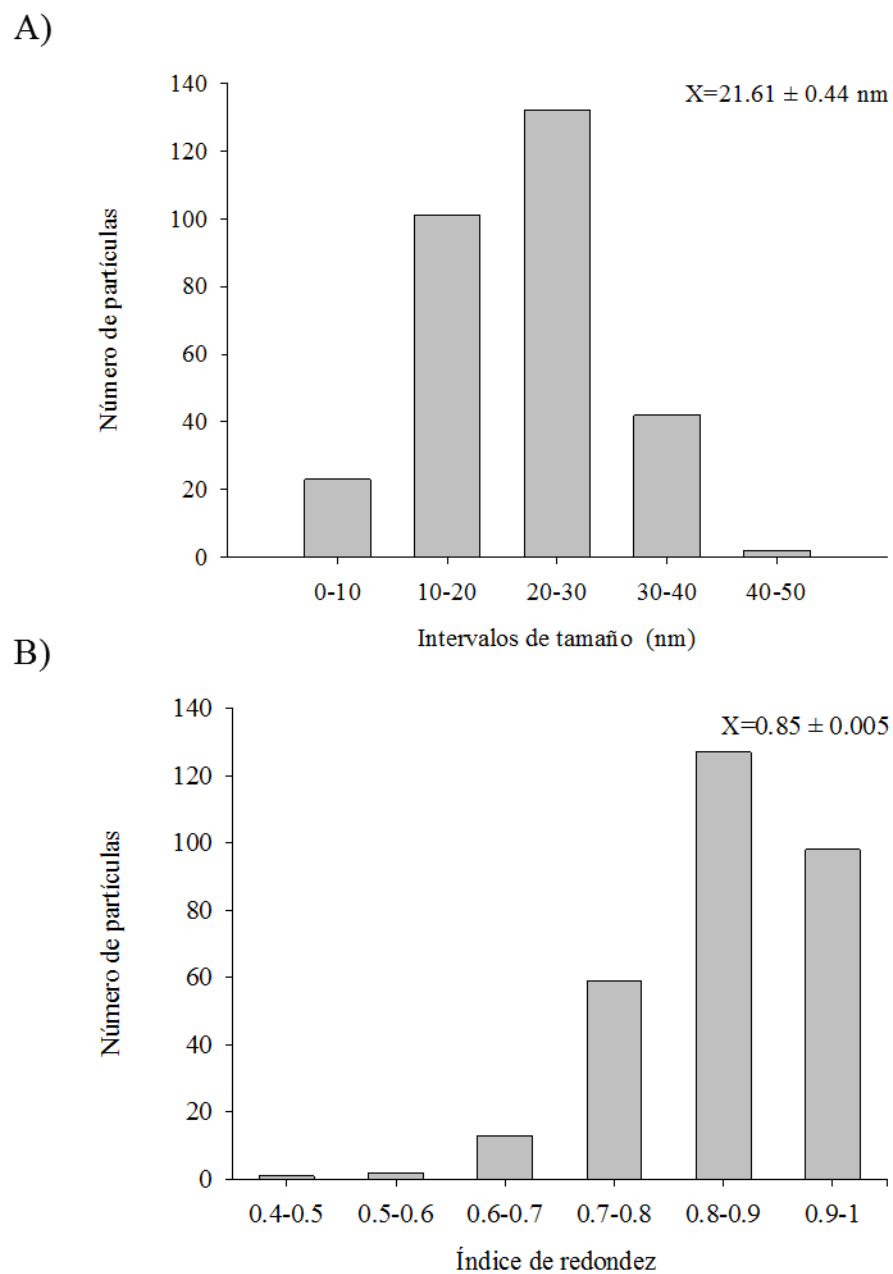


Figura 6. Histogramas de la distribución de tamaños de NPs de Ag e índice de redondez sintetizadas con *C. sinensis* a 22° C. A) Distribución de tamaños de NPs de Ag, B) Índice de redondez calculado como diámetro menor entre diámetro mayor. El inserto corresponde a la media \pm error estándar, n=300.

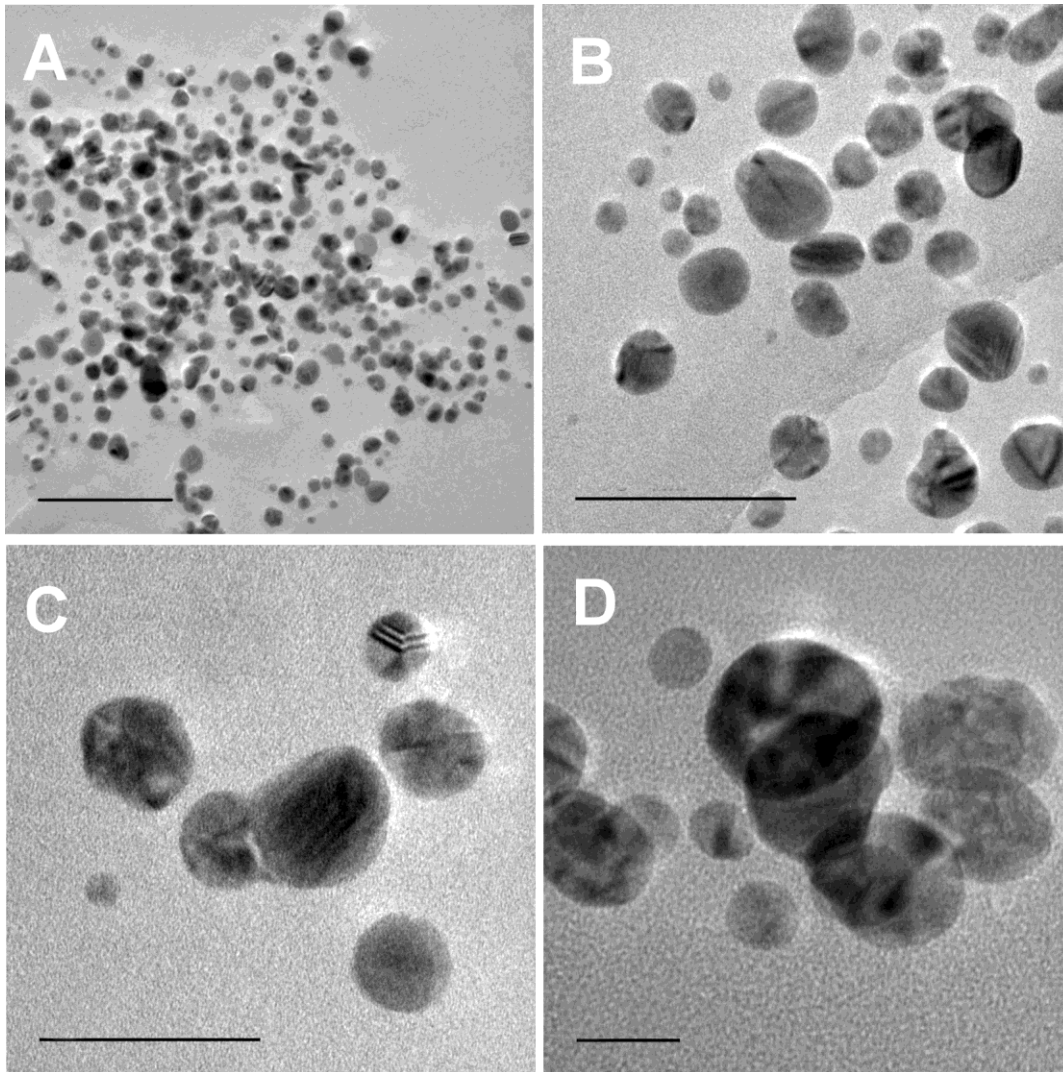


Figura 7. Micrografías electrónicas de NPs de Ag sintetizadas con *C. sinensis* a 22°C. Volumen de extracto 3 mL con 5 mL de AgNO₃ 10 mM, con Microscopía Electrónica de Transmisión. A) Barra= 200 nm, B y C) Barra= 100 nm, D) Barra= 20 nm

5.2 Colonización micorrízica en *T. repens*

Los resultados mostraron que la presencia de NPs de Ag, no afectó el establecimiento de la simbiosis entre la raíz de *T. repens* y *R. intraradices* (HMA), independientemente de las concentraciones utilizadas (1, 10 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de las NPs de Ag en el porcentaje de colonización micorrízica arbuscular y estructuras micorrízicas de *Rhizophagus intraradices* en las raíces de la planta de *Trifolium repens*.

NPs de Ag ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Colonización micorrízica arbuscular (%)	Estructuras micorrízicas (%)		
		Hifas	Vesículas	Arbúsculos
0	89.76 \pm 1.70 b	38.57 \pm 4.67a	50.71 \pm 4.36a	0.48 \pm 0.44
1	91.67 \pm 1.12 a	36.19 \pm 5.04a	55.48 \pm 5.00a	0
10	95.00 \pm 1.47 a	35.00 \pm 4.76a	60.00 \pm 5.81a	0
100	69.76 \pm 11.77 c	21.67 \pm 6.64a	48.09 \pm 14.59a	0

Media \pm error estándar, n=7. Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Los porcentajes mayores de colonización (92% y 95%) se encontraron en las concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mientras que en el testigo fue de 89%. De esta manera las NPs promovieron significativamente la colonización en estas concentraciones. Esta respuesta puede estar relacionada al efecto conocido como hormesis, el cual se refiere a un fenómeno dosis-respuesta, en el que dosis bajas inducen estimulación y concentraciones altas inducen inhibición de la respuesta, cuando están presentes metales o metaloides (Poschenrieder *et al.*, 2013; Bello-Bello *et al.*, 2017). La hormesis se entiende como una respuesta adaptativa dinámica o plasticidad biológica del organismo a factores leves de estrés, intermitentes y de diversas categorías (Calabrese, 2013). Esta respuesta del incremento de la colonización micorrízica se observó en *T. repens*, (aunque no se utiliza el término hormesis) donde fueron

utilizadas bajas concentraciones de NPs de Ag 0.1 y 1.0 mg kg⁻¹ inoculado con *Glomus caledonium* (Feng *et al.*, 2013).

En contraste, la colonización se redujo 30% en la concentración de 100 µg mL⁻¹ (Cuadro 3). Reducciones similares en la colonización se han reportado utilizando 36 mg kg⁻¹ de NPs de Ag de 15 nm en *Lycopersicon esculentum* (30%); 200 mg kg⁻¹ de NPs de Ag y Ti en *Helianthus annuus* con *R. intraradices* (45%) (Noori *et al.* 2017; Dubchak *et al.*, 2010). Las NPs de ZnO a concentraciones mayores a 800 mg kg⁻¹ disminuyen la colonización micorrízica de *Zea mays* (plantas inoculadas con *Glomus versiforme* o *Glomus caledonium*, ahora *Funneliformis caledonium*) (Wang *et al.*, 2016).

Los estudios sobre los efectos de las NPs metálicas en la colonización micorrízica no son suficientes; no obstante, estudios previos, muestran que la respuesta de la colonización ante las NPs depende no sólo de la planta, sino de las características de la NPs tamaño, tipo, concentración) y del inóculo de HMA. En el caso de raíces de *Trigonella foenum-graecum*, inoculadas con *Glomus intraradices* (ahora *Rhizophagus intraradices*), la colonización se redujo a dosis bajas de NPs de ZnO (375 mg kg⁻¹) pero no cuando las concentraciones aumentaron (Siani *et al.*, 2017) caso contrario a lo encontrado en este estudio. Además, las especies vegetales difieren en su reacción a la exposición a NPs, ya que algunas muestran efectos positivos al aumento de la concentración de NPs de Ag (Feng *et al.*, 2013), mientras que otras muestran efectos tóxicos. Por lo anterior, se sugiere ampliar las investigaciones de la dosis-respuesta considerando las características mencionadas.

Para la colonización micorrízica es necesario cuantificar estructuras fúngicas tales como: arbusculos, vesículas y esporas consideradas como indicadores del establecimiento de la simbiosis (Orchard *et al.*, 2017). En el presente estudio se encontró que el HMA, *R. intraradices*

es tolerante a la presencia de diferentes concentraciones de NPs de Ag, al producir estructuras micorrízicas, como son hifas, arbusculos, y una gran cantidad de vesículas (Cuadro 3, Figura 8). Las NPs de Ag, no tuvieron efectos significativos ($p \leq 0.05$) en el porcentaje de estructuras micorrízicas totales (Cuadro 3) en los tratamientos utilizados. A pesar de esto, se puede observar una tendencia que conforme aumenta la concentración disminuye el porcentaje de hifas, las hifas intraradicales se pueden dividir dicotómicamente para formar arbusculos (vida corta) o vesículas formadas en la parte terminal (Barker *et al.*, 1998), y en la concentración 1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, las vesículas aumentan y dan como resultado el aumento de la colonización total. Las vesículas de los hongos micorrízicos tienen la función de almacenamiento de nutrientes, principalmente fósforo (P), lípidos, y como propágulos (Olsson *et al.*, 2011), así como almacenar una gran cantidad de metales pesados y compuestos tóxicos (Yang *et al.*, 2015). Se ha reportado que el estrés por metales como Pb aumentó el número de vesículas. Posiblemente la abundancia de vesículas se deba a que estas estructuras estén almacenando las NPs de Ag, aunque, para confirmar esto se necesitarían hacer análisis como Emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE) (Olsson *et al.*, 2011) o Fluorescencia de Rayos X (XRF) para detectar la concentración de plata en vesículas.

Estas estructuras son de interés por la protección que proporcionan a las plantas, especialmente por el secuestro de exceso de metales, limitando la disponibilidad y acumulación de éstos en la planta (Weiersbye *et al.*, 1999). Este es un mecanismo por el cual las micorrizas pueden prevenir la toxicidad del metal al fitobionte. Pero también se ha propuesto que los metales almacenados en las vesículas pueden traslocarse al resto de la planta (Olsson *et al.*, 2011).

Por lo tanto, es importante hacer investigaciones tomando en cuenta el efecto dosis-respuesta no solo de las plantas, sino también cuando se encuentran en asociación con otros microorganismos del suelo y trabajos donde involucre la aplicación de mayores concentraciones a las de este estudio en un gradiente de concentración.

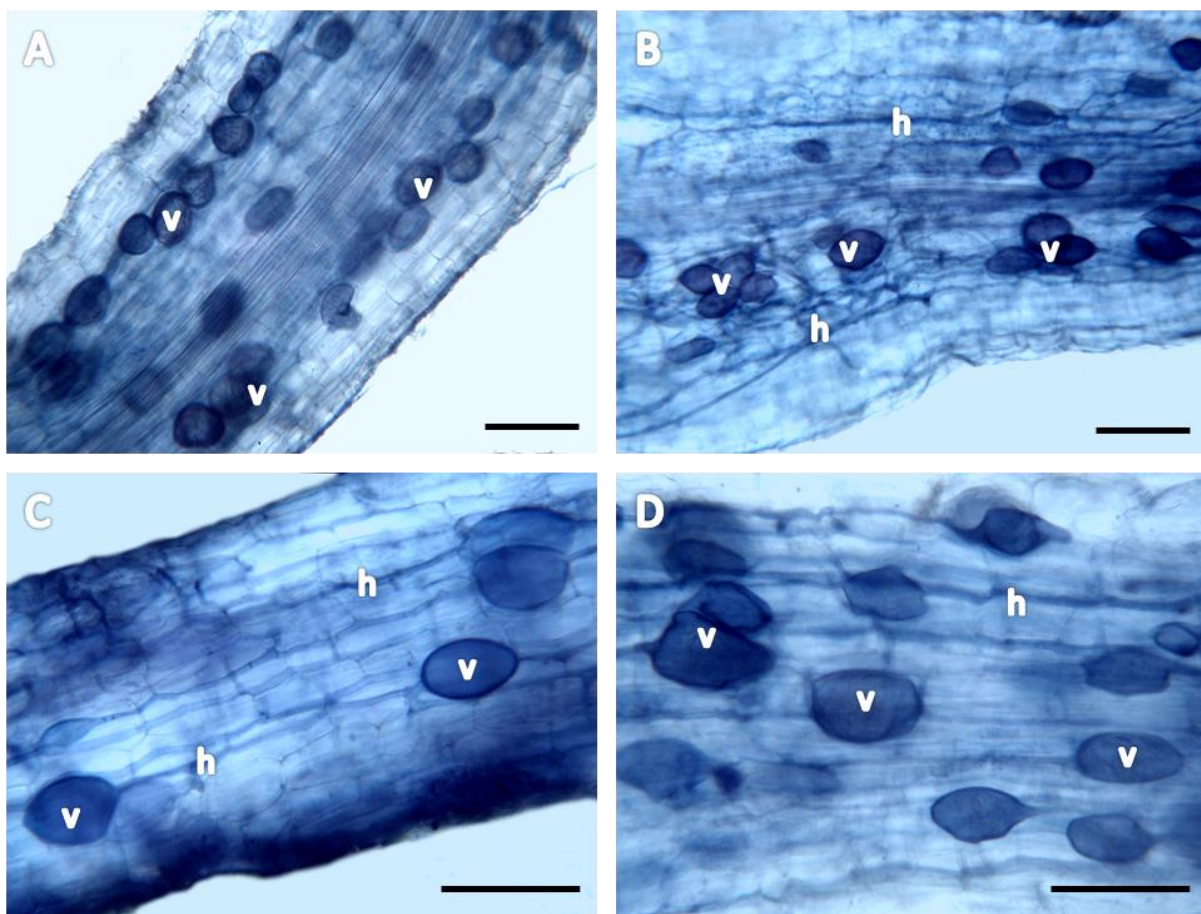


Figura 8. Colonización micorrízica arbuscular del (HMA) *Rhizophagus intraradices* en las raíces de *T. repens* en presencia de NPs de Ag. A) $0 \mu\text{g mL}^{-1}$; B) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; C) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; D) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. A-B, barra= $100\mu\text{m}$; C-D, barra= $75\mu\text{m}$.

5.3 Población de esporas en el sustrato

El número de esporas en el sustrato (10 g) aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) en el tratamiento $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ NPs Ag (107%) en comparación con el testigo, por el contrario la población disminuyó en un 83% en el tratamiento de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ NPs de Ag (Figura 9). De la misma manera se ha reportado que cuando son aplicadas altas concentraciones de NPs de Ag ($800 \mu\text{g kg}^{-1}$) se reduce el 50% el número de esporas comparadas con el testigo (Abd-Alla *et al.*, 2016). Está documentado la capacidad de las esporas del género *Glomus* para absorber metales en el citoplasma (Cornejo *et al.*, 2013), por lo tanto, pueden almacenar elementos tóxicos en los tejidos y así disminuir la toxicidad de los metales pesados a las plantas y otros microorganismos (Weiersbye *et al.*, 1999), probablemente en este estudio las esporas tengan la capacidad de acumular el contaminante, como una forma de evitar el estrés. Por el contrario, en la concentración más alta ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), donde el estrés es mayor, las NPs de Ag disminuyeron la generación de esporas. Regvar *et al.* (2001), mencionan que los suelos contaminados con metales pesados presentan una baja diversidad de esporas de HMA esto comparado con los sitios no contaminados, lo anterior apoya los resultados obtenidos en esta investigación.

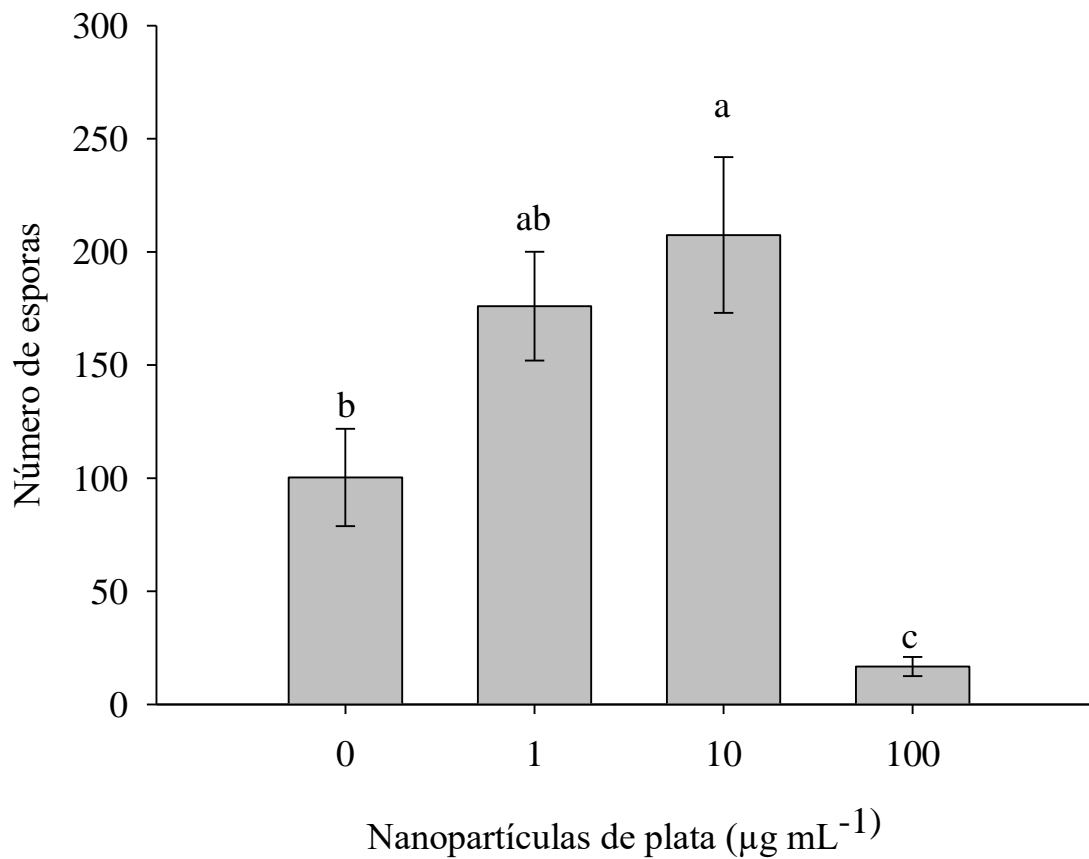


Figura 9. Efecto de las NPs de Ag en el número de esporas en 10 g de sustrato (después de 150 d). Media \pm error estándar, n=7. Letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$).

5.4 Biomasa fresca y seca de vástago y raíz

5.4.1 Biomasa fresca

El crecimiento se refiere a un incremento irreversible de las dimensiones de la planta, masa, forma, dando como resultado un aumento cuantitativo del tamaño y peso de la planta (Kru, 1997). El análisis de crecimiento ha sido usado ampliamente para el estudio de los factores que influyen el desarrollo de la planta y el rendimiento, a través del seguimiento de la acumulación de materia fresca y seca durante el tiempo (Gardner *et al.*, 1985). la acumulación de peso fresco suele tener mayor significancia comercial, sin embargo también permite tener información al evaluar efectos de tratamientos experimentales.

La biomasa fresca de vástago (BFV) fue afectada por la concentración de NPs de Ag, pero no por la inoculación con HMA, además se encontró que hay interacción entre HMA-NPsAg (Cuadro 4).

Se observó mayor biomasa fresca de vástago cuando la planta está inoculada con HMA, pero sin la exposición a NPs de Ag; mientras que el aumento a la concentración $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs de Ag, disminuyó la BFV en un 62% (Cuadro 4). En contraste, en otro estudio, la exposición a NPs de Ag recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP) (17.2 nm) a partir de 1 mg L^{-1} disminuyó la BFV 56–72% en soya (*Glycine max*) y 36–67% para el arroz (*Oryza sativa* L.) (Li *et al.*, 2017), lo cual difiere de este estudio. Hay que señalar que, en este estudio, las combinaciones HMA- $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y HMA- $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs de Ag no mostraron diferencias significativas entre ellas, pero sí respecto al testigo y se observó una reducción del 22% y 37% respectivamente.

En contraste, cuando *T. repens* no es inoculada (-HMA o SHMA), la concentración $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, no fue diferente del testigo. A diferencia, las demás combinaciones SHMA- $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y SHMA- $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs de Ag, no fueron diferentes entre ellas, ni respecto al testigo, pero

sí de la concentración $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Cuadro 4). La BFV de trigo var. NARC-2009 (*Triticum aestivum*) se vio afectada con la exposición de NPs de Ag (10-20 nm), a partir de 25ppm hasta 150 ppm (Jhanzab *et al.*, 2015)

En relación a la biomasa fresca de raíz (BFR), ésta fue afectada por la inoculación con HMA y la concentración de NPs de Ag; además, se encontró interacción entre HMA-NPsAg (Cuadro 4). El efecto de la inoculación con HMA, en todas las concentraciones ($1, 10$ y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$), encontrándose una reducción de BFR de 40%, 37% y 57% con respecto al testigo (Cuadro 4). Cuando no hay inoculación (-HMA), el análisis estadístico indica que la concentración $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, no difiere del testigo, pero sí del resto de los tratamientos. Conforme aumenta la concentración a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ la BFR se reduce un 36% comparado con el testigo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de la presencia de NP de Ag en la biomasa fresca de vástago (BFV) y biomasa fresca de raíz (BFR) de *T. repens*, 90 d después de la inoculación con *Rhizophagus intraradices*.

NPs de Ag ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Biomasa fresca(g)			
	Vástago		Raíz	
	+HMA	-HMA	+HMA	-HMA
0	4.49 \pm 0.25 a	3.27 \pm 0.19 ab	2.56 \pm 0.31 a	2.65 \pm 0.21 ab
1	3.49 \pm 0.08 b	4.01 \pm 0.22 a	1.52 \pm 0.10 b	3.42 \pm 0.27 a
10	2.84 \pm 0.27 b	3.00 \pm 0.09 b	1.60 \pm 0.17 b	2.02 \pm 0.18 bc
100	1.70 \pm 0.10 c	2.58 \pm 0.17 b	1.08 \pm 0.07 b	1.69 \pm 0.10 c
Significancia				
HMA	NS		0.0001	
NPs de Ag	0.0001		0.0001	
HMA-NPsAg	0.0001		0.001	

+HMA: con inoculación; -HMA: sin inoculación. Media \pm error estándar, n=5. Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Se encontró interacción entre HMA-NPsAg, por lo que se fijó el factor inoculación y se comparó con cada nivel de concentración.

5.4.2 Biomasa seca

La biomasa seca es un indicador del crecimiento óptimo y rendimiento de las plantas (Siani *et al.*, 2017). La producción de biomasa seca es el resultado de la eficiencia del follaje del cultivo en la intercepción y utilización de la radiación solar disponible durante el ciclo de crecimiento y la biomasa puede ser influenciada por factores internos de crecimiento relacionados con el genotipo o factores externos relacionado con el ambiente donde están establecidas las plantas (Santos *et al.*, 2010).

La biomasa seca de vástago (BSV), la concentración de NPs de Ag tuvo efecto significativo ($p \leq 0.05$), pero la inoculación con HMA no; además, se encontró interacción entre HMA-NPsAg (Cuadro 5). El efecto de la exposición, de plantas con HMA, a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs de Ag en el sustrato, promovió una reducción significativa (48%), en la biomasa seca del vástago (BSV) comparado con el testigo. Este efecto ha sido observado en *Solanum lycopersicum* asociada a un consorcio de micorrizas a la misma concentración de NPs de Ag (Judy *et al.*, 2015). Lo que sugiere un daño de las NPs de Ag a la fotosíntesis, este proceso desempeña un papel fundamental en la producción de biomasa seca, las plantas son productores primarios y son responsables de convertir la energía solar en materia orgánica (Cvjetko *et al.*, 2017). Se sugiere efectos inhibitorios de la exposición a las NPs de Ag sobre la fotosíntesis, podrían estar relacionadas a la degradación del cloroplasto y asociado con el estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos de la membrana (Hatami *et al.*, 2016). Así como esta inhibición puede causar una falta de energía (carbohidratos) y una disminución de las reacciones bioquímicas y la tasa de división celular, por lo tanto, la producción de BS de *T. repens* se ve influenciado.

En contraste, en este estudio, las bajas concentraciones de NPs de Ag 1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no reducen la BSV y no son diferentes al testigo, esta respuesta sugiere un efecto protector de los HMA cuando hay bajas dosis de NPs de Ag.

Existen evidencias, sobre el efecto protector de los hongos micorrízicos ante el estrés provocado por NPs. En *Lycopersicon esculentum* (Brandywine) la inoculación con *Rhizophagus intrarradices* incrementó la BSV al aplicar 12 mg kg^{-1} -2nm de NPs de Ag, con respecto a las no inoculadas (Noori *et al.*, 2017). La aplicación de 125 $\mu\text{g g}^{-1}$ de NPs de ZnO redujo la BSV, mientras que la inoculación con HMA mitigó estos efectos (Siani *et al.*, 2017). El trabajo realizado por Wang *et al.* (2018) usando *Funneliformis mosseae* en presencia de NPs de ZnO (30 nm) en maíz, bajo diferentes niveles de P orgánico, encontraron que la inoculación con HMA mejoró significativamente los pesos secos de brotes (de 61% a 112%) en todos los tratamientos (50, 250 y 500 mg kg^{-1}).

El presente estudio demuestra el efecto hormético de dosis bajas de NPs de Ag (1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sin inoculación, para promover el incremento significativo de la BSV con respecto al testigo, 32% y 26% respectivamente; en contraste, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NPs de Ag no presenta diferencias significativas comparado con el testigo (Cuadro 5). Este efecto hormético de dosis respuesta de las NPs de Ag se observó en diferentes especies vegetales como vainilla (*Vanilla planifolia*); caña (*Saccharum spp*) (Bello-Bello *et al.*, 2017; Spinoso-Castillo *et al.*, 2017). Las concentraciones de 50 y 100 mg L^{-1} de NPs aumentaron la BSV de la vainilla mientras que la concentración más alta (200 mg L^{-1}) inhibió tal proceso. De la misma manera en el trabajo realizado por Judy *et al.* (2015) los resultados mostraron que a 10 mg kg^{-1} de Ag^+ las plantas de *Solanum lycopersicum* generaron significativamente (33%) más biomasa de brotes respecto al testigo.

Noori *et al.* (2017) informó que la biomasa del tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Brandywine) no fue afectada ante la exposición de NPs de Ag (12, 24, y 36 mg kg⁻¹-15 nm). Contrariamente a lo ocurrido en la BSV de trigo var. NARC-2009 (*Triticum aestivum*), donde se observó una reducción conforme aumentaban los gradientes de concentración a partir de 25 ppm (15%) de NPs de Ag, alcanzando una reducción del 55% cuando estaban expuestas a 150 pp (Jhanzab *et al.*, 2015). Pero estos resultados son contrarios a los encontrados en esta tesis.

Está documentado que los nanomateriales, no solo provocan efectos perjudiciales, también pueden mejorar la eficiencia fotosintética en las plantas al mejorar la absorción de luz, ampliando el espectro de la luz capturada y la transformación de la energía de los electrones en energía química (Hatami *et al.*, 2016). En este estudio se sugiere que bajas concentraciones de las NP de Ag promovieron la fotosíntesis, mejorando así la BSV de las plantas de *T. repens*. Además, Krishnaraj *et al.* (2012) encontraron que las NPs de Ag indujeron la biosíntesis de proteínas y carbohidratos en *Bacopa monnieri*.

La biomasa seca de raíz (BSR) fue significativamente afectada por la inoculación con HMA pero no por la concentración de NPs de Ag, también se encontró interacción entre HMA-NPsAg (Cuadro 5). No se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), en la BSR, en ninguno de los tratamientos con HMA y SHMA en cada una de las concentraciones de NPs utilizadas en esta investigación (Cuadro 5). Contrariamente a lo reportado en este estudio, Noori *et al.* (2017) informaron que la inoculación con *Funneliformis mosseae* mejoró los pesos secos de la raíz de maíz (de 54% a 130%) en presencia de NPs de ZnO bajo diferentes niveles de P orgánico. Además el peso seco de la raíz de las plantas expuestas a 36 mg kg⁻¹ de NPs de Ag de 15 nm aumentó significativamente el peso de la raíz seca en las plantas micorrizadas; los resultados sugirieron que la colonización micorrízica alivió la toxicidad dentro de la célula causado por el

estrés oxidativo de la raíz asociada con la exposición a las NPs de Ag, aunque el efecto parece depender tanto del tamaño de las partículas como de la concentración (Noori *et al.*, 2017). Los resultados anteriores sugirieron que las plantas expuestas a concentraciones más altas de NPs de Ag exhiben más tolerancia en el sistema radical, a expensas de la parte aérea y de la fotosíntesis, tal como pudo haber sucedido en este estudio al no ser afectado negativamente la BSR de *T. repens*.

Cuadro 5. Efecto de la presencia de NPs de Ag en la biomasa seca de vástago (BSV) y biomasa seca de raíz (BSR) de *T. repens*, 90 d después de la inoculación con *Rhizophagus intraradices*.

NPs de Ag ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Biomasa seca (g)			
	Vástago		Raíz	
	+HMA	-HMA	+HMA	-HMA
0	1.28±0.07 a	0.96±0.04 c	0.29±0.03 a	0.30±0.02 a
1	1.22±0.05 a	1.27±0.06 a	0.19±0.01 a	0.42±0.06 a
10	1.37±0.11 a	1.22±0.02 ab	0.28±0.03 a	0.39±0.02 a
100	0.66±0.02 b	0.99±0.04 bc	0.18±0.03 a	0.34±0.03 a
Significancia				
HMA	NS		0.0001	
NPs de Ag	0.0001		NS	
HMA-NPsAg	0.0001		0.033	

+ HMA: con inoculación; -HMA: sin inoculación. Media \pm error estándar, n=5. Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Se encontró interacción entre HMA-NPsAg, por lo que se fijó el factor inoculación y se comparó con cada nivel de concentración.

5.4.3 Área foliar

La aproximación del área foliar fue afectada significativamente ($p \leq 0.05$) por la concentración de NPs, pero no por la inoculación; además, se encontró interacción HMA-NPsAg (Cuadro 6). Las plantas inoculadas con HMA en la concentración $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ tuvieron menor área foliar (46%) comparadas con el resto de los tratamientos. Este resultado es similar a lo reportado por Abd-Alla *et al.* (2016), quienes demuestran un efecto inhibitorio de las NPs de Ag a la misma concentración en *Vicia faba* L. En cambio, las plantas de *T. repens* sin inocular reflejaron mayor área foliar cuando fueron tratadas con concentraciones bajas de NPs de Ag 1 y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, aumentando el área en 64% y 50% respectivamente, con respecto al testigo. Estos resultados muestran un efecto hormético de las NPs de Ag en el área foliar. Se ha afirmado que las bajas concentraciones de metales tóxicos inducen efectos horméticos a través de la activación de los mecanismos de defensa del estrés de las plantas (Poschenrieder *et al.*, 2013). Este es otro ejemplo donde se obtienen beneficios a la exposición de NPs de Ag a bajas concentraciones. Estos resultados son similares a lo reportado para trigo var. NARC-2009 (*Triticum aestivum*) en el que concentraciones bajas (25 ppm) de NPs de Ag promovieron significativamente el área foliar comparado con el testigo, no obstante conforme aumentaron los gradientes de concentración el área foliar se vio afectada (Jhazab *et al.*, 2015), estos resultados son similares a lo observado en la presente investigación con *T. repens*, en presencia de HMA y a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, el área foliar se redujo respecto el testigo (Cuadro 6). Lo cual indica que cuando se rebasa cierto umbral de concentración de NPs Ag se provoca toxicidad en la planta.

El área foliar está relacionado con la producción de materia seca, por lo tanto, cuando la primera es alta se espera una alta acumulación de materia seca, el área foliar determina una mayor o menor captación de energía lumínica durante el proceso de crecimiento (Hernández *et*

al., 2015). Esto es coherente con resultados obtenidos de área foliar y BSV, en los cuales los resultados son similares a 0, 1, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con inoculación. El área foliar da una relación de la producción de fotoasimilados. (Di Benedetto y Tognetti, 2016)

Cuadro 6. Efecto de las NPs de Ag en el área foliar de *Trifolium repens*, inoculadas con *Rhizophagus intraradices*.

NPs de Ag ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área foliar (cm^2)	
	+HMA	-HMA
0	56.07 \pm 2.96 a	41.85 \pm 4.87 b
1	59.42 \pm 4.37 a	68.76 \pm 3.88 a
10	59.19 \pm 2.11 a	62.75 \pm 6.68 a
100	25.63 \pm 1.82 b	40.24 \pm 1.81 b

Significancia

HMA	NS
NPs de Ag	0.0001
HMA-NPsAg	0.014

+HMA: con inoculación; -HMA sin inoculación. Media \pm error estándar, n=5. Letras diferentes entre concentraciones son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Se encontró interacción entre HMA-NPsAg, por lo que se fijó el factor inoculación y se comparó con cada nivel de concentración.

5.5 Fluorescencia de la clorofila

En esta investigación, el rendimiento del fotosistema II (Fv/Fm) fue significativamente afectado por: la inoculación con HMA y por la concentración de NPs de Ag y se encontró interacción entre HMA-NPsAg (Figura 10).

La fluorescencia de la clorofila en las plantas inoculadas con HMA no fue afectado negativamente ante la exposición de 1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, pero en la concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sí se redujo 6% la fluorescencia de la clorofila (Figura 10). En contraste, en las plantas no inoculadas (SHMA), 0, 1 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, no difirieron en la fluorescencia de la clorofila, mientras que a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se observó una reducción del rendimiento del fotosistema II (Fv/Fm) del 13% (Figura 10).

Los valores máximos de eficiencia de la fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) en plantas sanas son mayores a 0.65 (Wang *et al.*, 2014). De acuerdo con este valor, la exposición de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs de Ag provocó daño al fotosistema II. La disminución en la fluorescencia de clorofila sugiere menor rendimiento de los centros de reacción de la plastocianina, para catalizar la transferencia eficiente de los electrones entre el PSII (citocromo b6f) y el PSI; implicando un posible daño en la capacidad del aparato fotosintético para utilizar toda la energía captada por los pigmentos antena (Küpper *et al.*, 2002). Aunque hay diferencias significativas entre tratamientos, en presencia del hongo y la concentración más alta de NPs de Ag (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), la fluorescencia de la clorofila *a* no fue inferior a 0.65. Los resultados muestran que la función de las micorrizas es proteger de cierta manera a las plantas al reducir el efecto de la NPs de Ag en la fluorescencia de la clorofila durante el estrés abiótico. De manera similar *Funneliformis mosseae* impidió una reducción importante en el rendimiento de la fotoquímica del fotosistema II (PSII) en presencia de atrazina (Fan *et al.*, 2018). Es conocido el efecto de la simbiosis con HMA en aumentar la eficiencia fotosintética (Bago *et al.*, 2000).

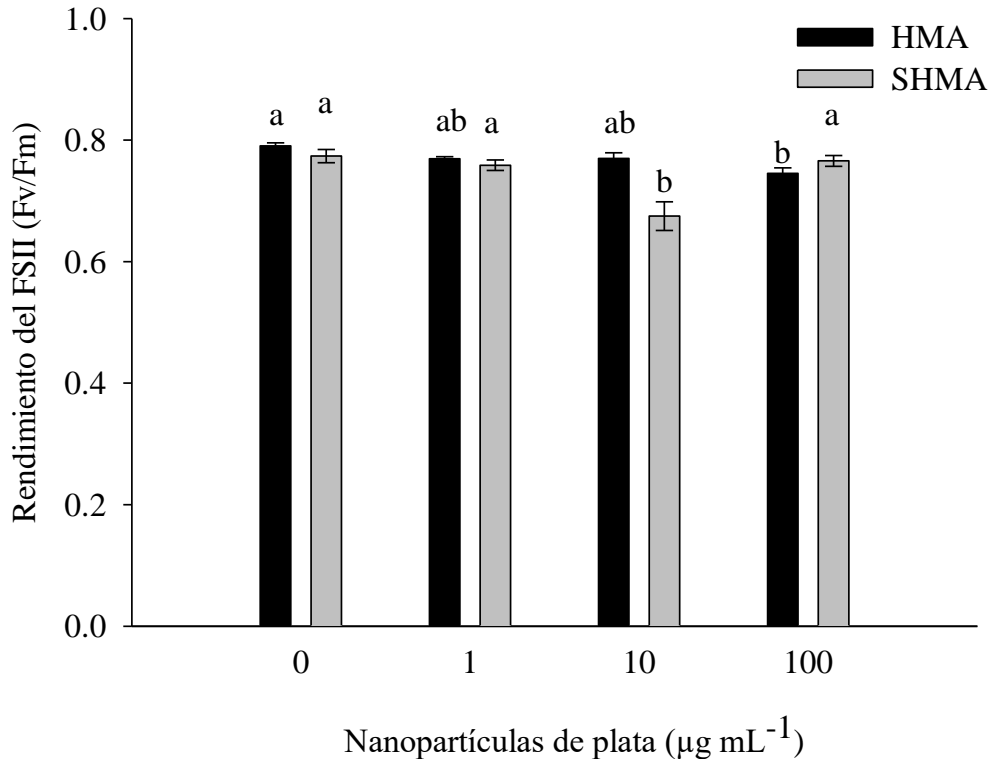


Figura 10. Efecto de la presencia de NPs de Ag en el Rendimiento fotoquímico máximo del PSII de *Trifolium repens*. Media \pm error estándar, n=5. Letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). Significancia factor HMA= 0.0033, factor NPs de Ag= 0.0001 e interacción HMA-NPsAg = 0.0001. Se encontró interacción entre HMA-NPsAg, por lo que se fijó el factor inoculación y se comparó con cada nivel de concentración.

La entrada de NPs dentro de las células, provoca que estos nanomateriales puedan interactuar con orgánulos y alterar los procesos metabólicos, producir estrés oxidativo y modificaciones genéticas (Hatami *et al.*, 2016). Las NPs de Ag pueden inducir estrés oxidativo en plantas (Dimkpa *et al.* 2012). En el presente este estudio, aunque no se determinaron las enzimas antioxidantes, es importante resaltar el efecto que tienen en el metabolismo secundario de las plantas. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden causar daños oxidativos en el ADN

nuclear, cloroplástico y mitocondrial (Imlay y Linn, 1988), afectar orgánulos y estructuras celulares, proteínas, carbohidratos, lípidos, metabolitos secundarios (Ma *et al.*, 2015)

Estructura radical con Microscopía de luz y Microscopía Electrónica de Barrido

La raíz principal de las plantas de *T. repens*, a 4 cm debajo del cuello de la raíz, presentaron crecimiento secundario (Hay *et al.*, 1986). La raíz en corte transversal, en todos los tratamientos presentó una peridermis de 2-4 estratos. La corteza presentó floema secundario y la presencia de abundantes fibras; además, se observaron radios dilatados de (2-4 células). El cilindro vascular presentó cambium vascular activo produciendo xilema secundario hacia adentro y floema secundario hacia afuera (Figura 11-14, A-H).

Los elementos de vaso presentaron engrosamiento de pared del tipo reticulado. Las variables medidas: diámetro de la raíz, diámetro del cilindro vascular, diámetro de la corteza y número de estratos de la peridermis, no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ni respecto al testigo (Cuadro 7).

Por otra parte, se observó que la presencia de NPs de Ag no tuvo efecto en la generación de espacios intercelulares en la raíz de *T. repens* (Cuadro 8).

Resultados similares fueron reportados para *Bacopa monnieri* Linn., expuestas 30 d a concentraciones de NPs de Ag (10 ppb, 100 ppb, 10 ppm y 100 ppm), los tratamientos no causaron efectos en la morfología y anatomía de la raíz (Krishnaraj *et al.*, 2012) pero el transporte de NPs de la raíz a la hoja está documentado en esta especie.

En *T. repens* no se observaron cambios en la biomasa ni anatomía de la raíz, pero la concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ redujo la biomasa fresca y seca del vástago, área foliar y eficiencia del fotosistema II, sin embargo, falta realizar más estudios y evaluar la concentración de plata en la parte aérea para evaluar la translocación de este elemento hacia tallos y hojas.

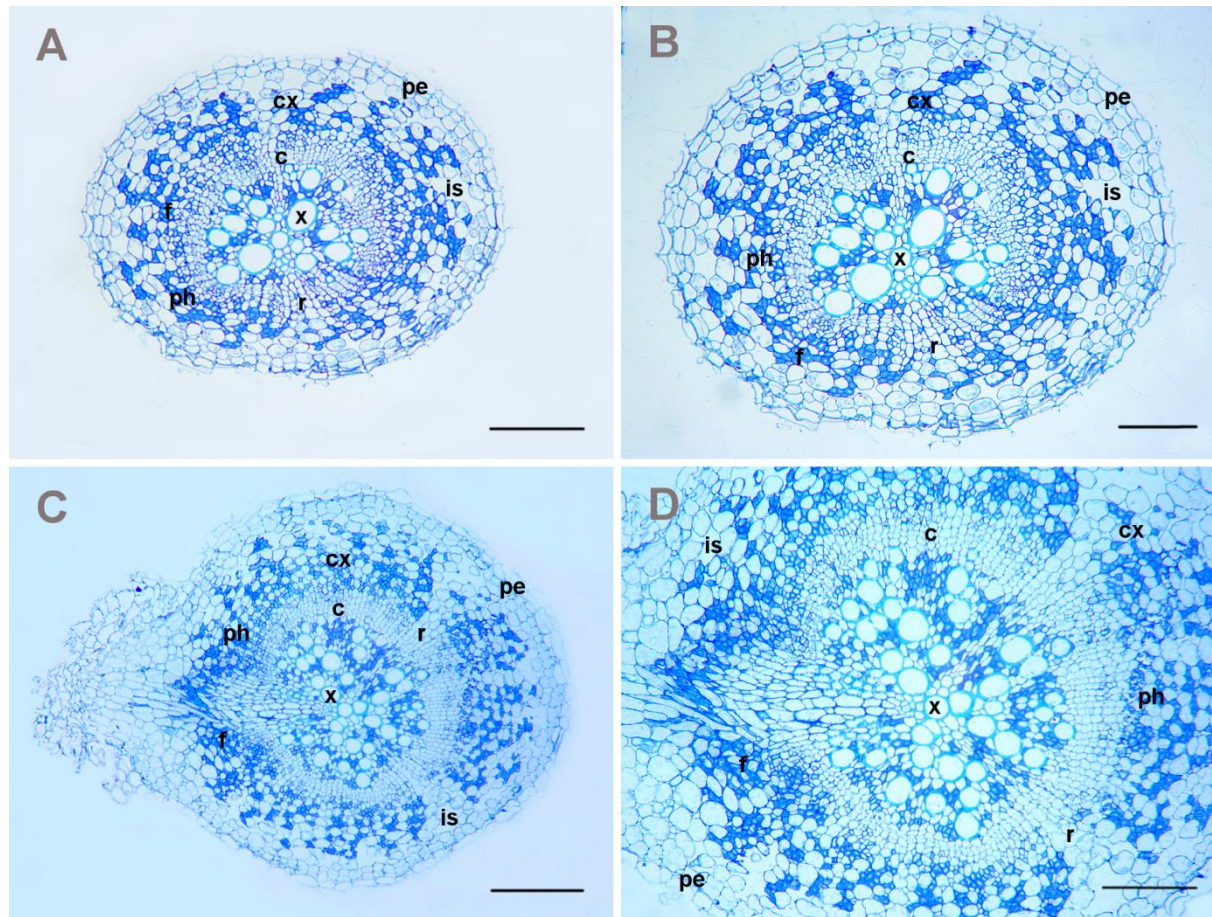


Figura 11. Anatomía transversal de la raíz secundaria de *Trifolium repens* sin presencia de NPs de Ag, teñidas con azul de metileno y Azure. A-B con *Rhizophagus intraradices* (HMA); C-D sin hongo (SHMA); A-C barra= 200 μ m; B-D barra=100 μ m. pe = peridermis, cx = corteza, c = cambium vascular x = xilema secundario, ph = floema secundario, r = radio, is = espacio intercelular y f = fibras.

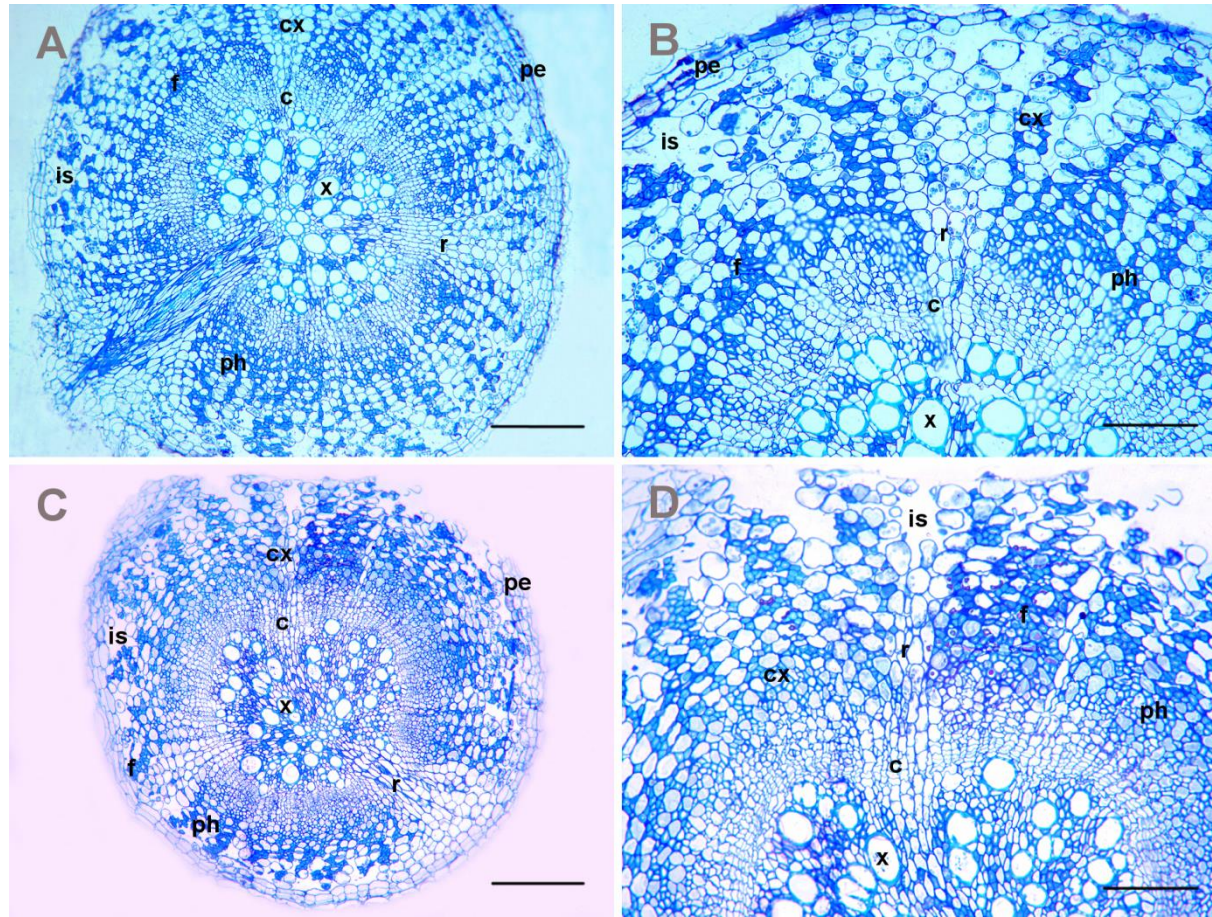


Figura 12. Anatomía transversal de la raíz secundaria de *Trifolium repens* en presencia de NPs de Ag ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), teñidas con azul de metileno y Azure. A-B con *Rhizophagus intraradices* (HMA); C-D sin hongo (SHMA); A-C barra= 200 μm ; B-D barra=100 μm . pe = peridermis, cx = corteza, c = cambium vascular x = xilema secundario, ph = floema secundario, r = radio, is = espacio intercelular y f = fibras.

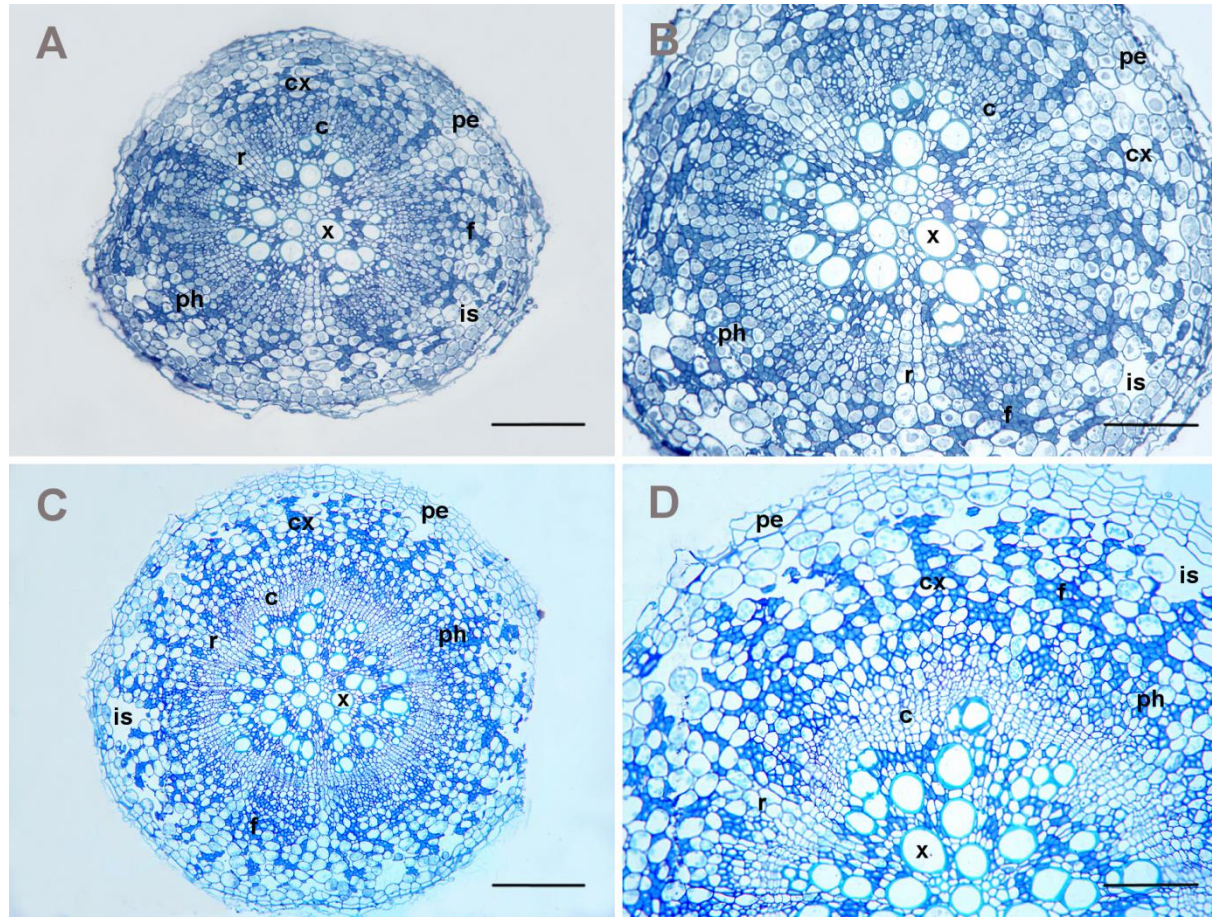


Figura 13. Anatomía transversal de la raíz secundaria de *Trifolium repens* en presencia de NPs de Ag ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), teñidas con azul de metileno y Azure. A-B con *Rhizophagus intraradices* (HMA); C-D sin hongo (SHMA); A-C barra= 200 μm ; B-D barra=100 μm . pe = peridermis, cx = corteza, c = cambium vascular x = xilema secundario, ph = floema secundario, r = radio, is = espacio intercelular y f = fibras.

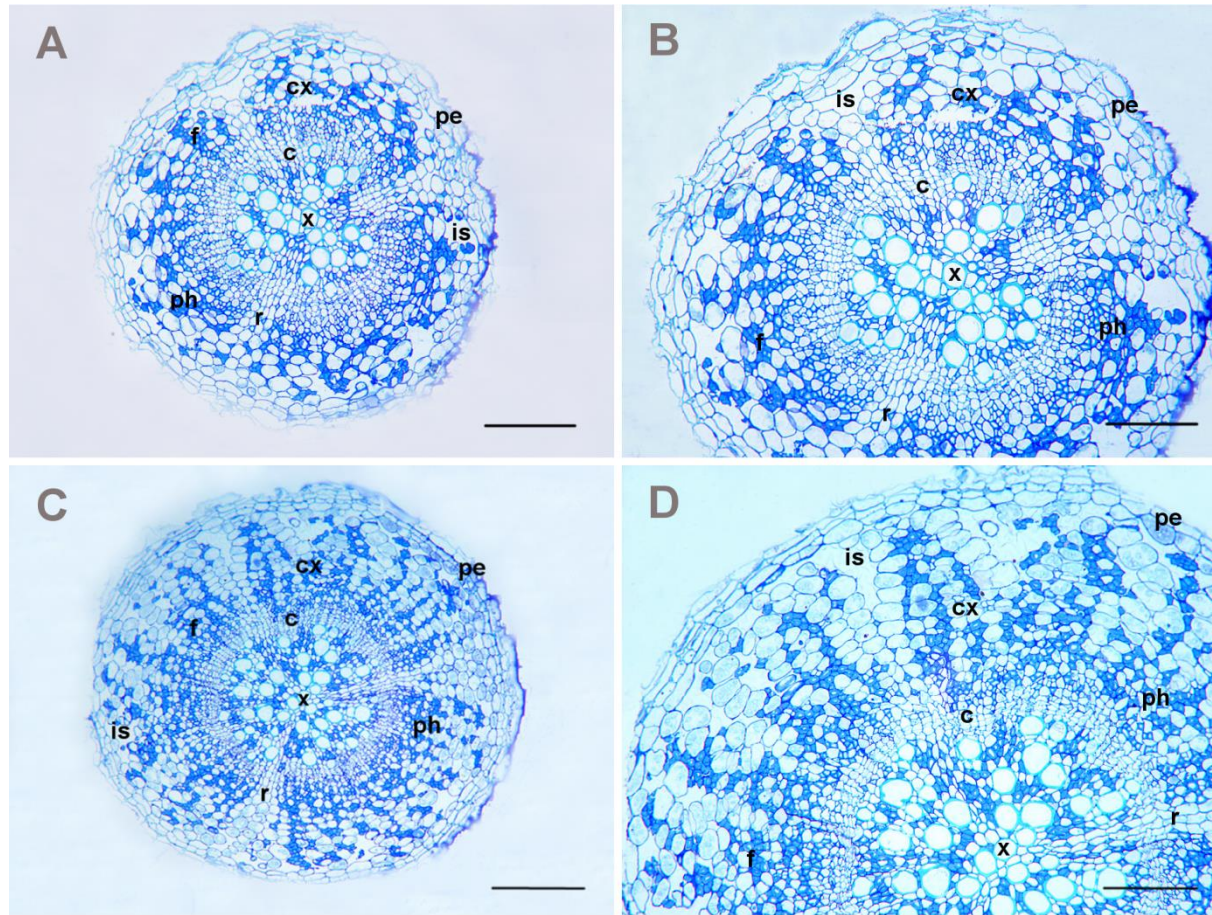


Figura 14. Anatomía transversal de la raíz secundaria de *Trifolium repens* en presencia de NPs de Ag ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), teñidas con azul de metileno y Azure. A-B con *Rhizophagus intraradices* (HMA); C-D sin hongo (SHMA); A-C barra= 200 μm ; B-D barra=100 μm . pe = peridermis, cx = corteza, c = cambium vascular x = xilema secundario, ph = floema secundario, r = radio, is = espacio intercelular y f = fibras.

Cuadro 7. Efecto de la presencia de NPs de Ag en el diámetro de la raíz, diámetro del cilindro vascular y diámetro de la corteza secundaria de *Trifolium repens* en corte transversal inoculadas con *Rhizophagus intraradices* (HMA)

NPs de Ag ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Diámetro raíz (mm)		Diámetro cilindro vascular (mm)		Ancho de corteza (mm)		Estratos de peridermis	
	+HMA	-HMA	+HMA	-HMA	+HMA	-HMA	+HMA	-HMA
0	0.96±0.17 a	0.68±0.06 a	0.42±0.08 a	0.30± 0.03 a	0.27±0.05 a	0.20±0.01 a	2.75±0.41 a	3.50±0.25 a
1	1.13±0.08 a	0.77±0.08 a	0.48±0.03 a	0.31±0.04 a	0.33±0.03 a	0.22±0.03 a	3.50±0.25 a	3.00±0.00 a
10	0.97±0.09 a	1.06±0.08 a	0.41±0.05 a	0.40±0.01 a	0.26±0.02 a	0.33±0.05 a	2.75±0.22 a	3.25±0.22 a
100	0.81±0.10 a	0.75±0.03 a	0.30±0.03 a	0.29±0.03 a	0.25±0.04 a	0.22±0.01 a	3.00±0.00 a	3.25±0.22 a
Significancia								
HMA		NS		NS		NS		NS
NPs de Ag		NS		NS		NS		NS
HMA-NPsAg		NS		NS		NS		NS

+HMA: con inoculación; -HMA sin inoculación. Media \pm error estándar de la media (n=4). No se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos en sus correspondientes variables (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 8. Efecto de la presencia de NPs de Ag en el área relativa (%) de espacios intercelulares, en corte transversal de la corteza secundaria de la raíz de *T. repens*, inoculadas con *Rhizophagus intraradices*.

NPs de Ag ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Tejido radical (%)		Espacios intercelulares (%)	
	+HMA	-HMA	+HMA	-HMA
0	86.53 \pm 4.50 a	89.76 \pm 1.98 a	13.47 \pm 4.50 a	10.24 \pm 1.98 a
1	88.86 \pm 3.04 a	88.84 \pm 3.36 a	11.14 \pm 3.04 a	11.16 \pm 3.36 a
10	91.31 \pm 2.47 a	88.03 \pm 2.73 a	8.69 \pm 2.47 a	11.97 \pm 2.73 a
100	90.34 \pm 2.13 a	87.48 \pm 2.06 a	9.66 \pm 2.13 a	12.52 \pm 2.06 a
Significancia				
HMA		NS		NS
NPs de Ag		NS		NS
HMA-NPsAg		NS		NS

+HMA: con inoculación; -HMA sin inoculación. Media \pm error estándar, n=4. No se presentan diferencias estadísticas entre tratamientos en sus correspondientes variables (Tukey, $p \leq 0.05$).

El número de vasos fue significativamente afectado por la inoculación con HMA, por la concentración de NPs de Ag pero no se encontró interacción entre HMA-NPsAg (Cuadro 9). El efecto de la presencia de las NPs cuando hay inoculación (+HMA) en las diferentes concentraciones 1, 10 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, aumentó significativamente el número de vasos del xilema secundario en un 215%, 113% y 60%, respectivamente; mientras que, cuando no se inoculó con el hongo, la única concentración diferente fue 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, la cual provocó una reducción del 26% en el número de vasos (Cuadro 9).

El diámetro de los vasos de xilema secundario fue significativamente afectado por la inoculación con HMA, por la concentración de NPs de Ag y se encontró interacción entre HMA-NPsAg (Cuadro 9). Sin embargo, cuando se inoculan las plantas (+HMA) los diámetros de los vasos no fueron afectados negativamente por ninguna de las concentraciones utilizadas; contrariamente, sin inoculación (-HMA) el diámetro promedio de los vasos aumentó 95% en presencia de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 133% en 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 136% en 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto de la presencia de NPs de Ag en el número y diámetro de vasos del xilema secundario de la raíz de *T. repens*, inoculadas con *Rhizophagus intraradices* (HMA).

NPs de Ag ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Número de vasos		Diámetro de vasos (μm)	
	+HMA	-HMA	+HMA	-HMA
0	37.25 \pm 3.34 b	50.25 \pm 8.81ab	29.75 2.31 a	24.03 0.66 b
1	117.25 \pm 27.42 a	53.50 \pm 9.79 ab	29.98 2.72 a	46.87 9.65 a
10	79.50 \pm 11.49 ab	67.25 \pm 7.18 ab	32.22 1.68 a	56.02 4.32 a
100	59.50 \pm 10.77 ab	37.00 \pm 4.46 b	29.51 4.27 a	56.76 3.85 a
Significancia				
HMA	0.0475		0.0003	
NPs de Ag	0.0230		0.0105	
HMA-NPs	NS		0.0175	
Ag				

Media \pm error estándar, n=3. Letras diferentes en la misma columna de diámetro de vasos son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Se encontró interacción entre HMA-NPsAg en el diámetro de vasos, por lo que se fijó el factor inoculación y se comparó con cada nivel de concentración.

5.5.1 Pubescencia de la raíz

La presencia de NPs de Ag modificó la pubescencia en la raíz de *T. repens*. La abundancia de pelos radicales dependió de la concentración de NPs de Ag aplicadas; la mayor abundancia de pelos radicales se presentó en el testigo ($0 \mu\text{g mL}^{-1}$) con HMA y SHMA y disminuyó conforme fue aumentando la concentración NPs Ag (Figura 15 A-H).

Además, la abundancia de pelos radicales también disminuyó cuando la planta no fue inoculada con HMA (Figura 15 F y G). Yin *et al.* (2011) reportaron el nulo desarrollo de pelos radicales de plántulas de *Lolium multiflorum* expuestas a 40 mg L^{-1} de NPs de Ag (6 y 25 nm). Aunque en el presente estudio la disminución de pelos radicales no fue completa en *T. repens* a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs de Ag, se presentó una reducción de la pubescencia. Mientras que la exposición a NPs Ag (10 ppb, 100 ppb, 10 ppm and 100 ppm) en *Bacopa monnieri*, no tuvo influencia en el desarrollo de pelos radicales (Krishnaraj *et al.*, 2012).

Los pelos de la raíz, tienen su origen en la rizodermis y se desarrollan para ayudar a absorber el agua y los nutrientes. Se ha observado que cuando hay presencia de NPs de Ag o Ag^+ , esta capacidad (para desarrollar pelos radicales) se ve afectada en *Arabidopsis thaliana* (Geisler-lee *et al.*, 2012).

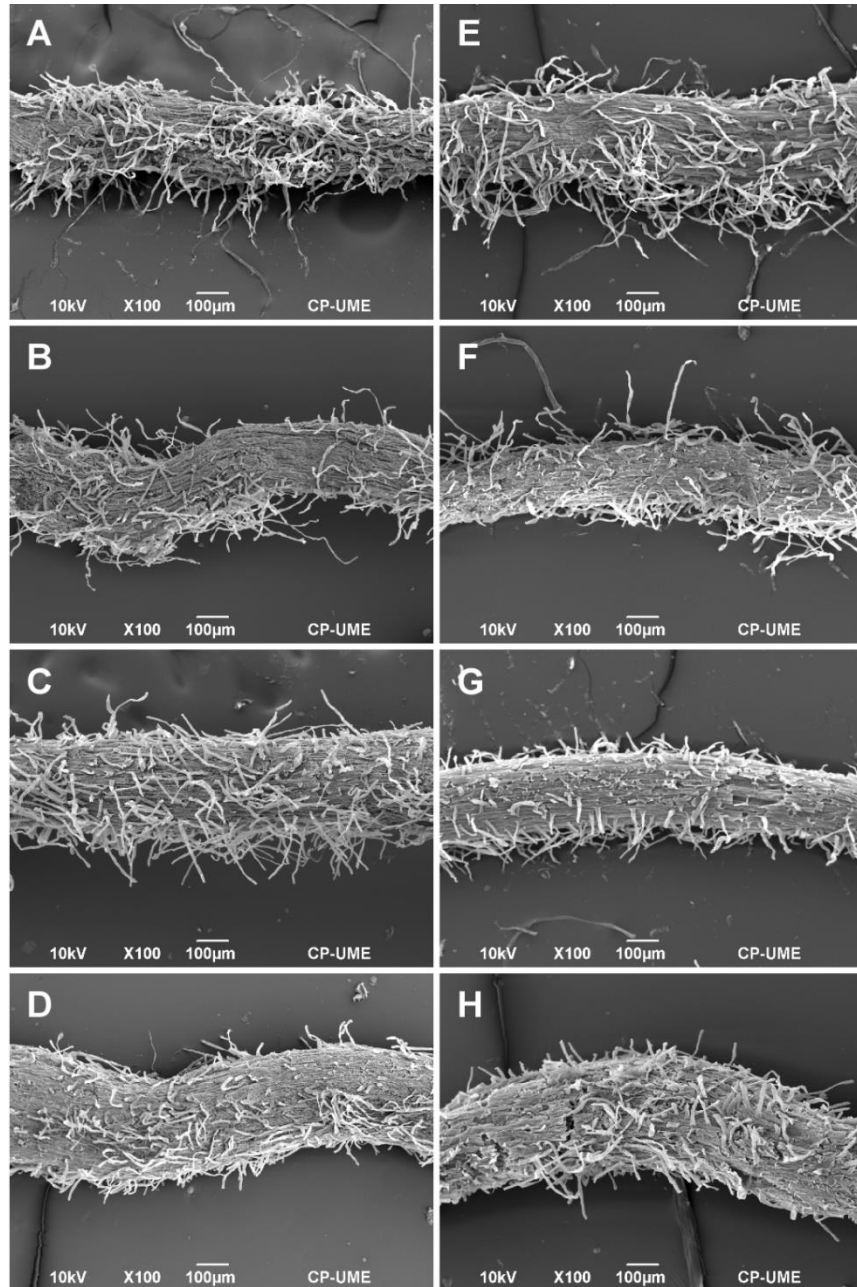


Figura 15. Efecto de las NPs de Ag en la pubescencia de raíz de *Trifolium repens* en la zona pilífera adyacente a la zona de diferenciación, en presencia de hongo micorrízico arbuscular (A-D) y sin hongo (E-H). Concentraciones de NPs Ag: $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A y E); $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (B y F); $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (C y G); $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (D y H).

5.6 Acumulación de Ag en raíz con Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma por Acoplamiento Inductivo (ICP-OES, Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer)

La concentración de plata en la planta fue afectada significativamente ($p \leq 0.05$) por la concentración de NPs, y por la inoculación con HMA; además, se encontró interacción HMA-NPsAg (Figura 16). Los resultados indican que la inoculación no impide la acumulación de Ag en la raíz. Asimismo, se observó que existe una correlación positiva ($p < 0.05$), entre las concentraciones utilizadas en este estudio y la acumulación de Ag en los tejidos radicales; de manera que las plantas expuestas a la concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, fueron las que más Ag acumularon en el tejido de la raíz (Figura 16). Hubo un aumento dependiente de la dosis en el contenido de Ag después de la exposición. En contraste Feng *et al.* (2013), encontraron que el contenido de Ag en los brotes de plantas sometidas a bajas concentraciones (0.01 y 0.1 mg kg^{-1}) tenían el mayor contenido de Ag, por lo que estos resultados sugirieron que la colonización micorrízica disminuye la acumulación de Ag en plantas expuestas a NPs. En otra investigación Noori *et al.* (2017) encontraron que las plantas de *Lycopersicon esculentum* micorrizadas acumularon en los tejidos 14% menos de Ag en comparación con las plantas no micorrizadas, cuando fueron expuestas a NPs de 2 nm, en contraste, bajo las mismas condiciones las plantas micorrizadas fueron expuestas a NPs de 15 nm la micorriza arbuscular no tuvo ningún efecto protector. En otro estudio, la concentración de Ag en brotes de *Solanum lycopersicum* aumentó en 10 y 100 mg kg^{-1} con la exposición a NPs de Ag con polivinilpirrolidona, Ag_2S y Ag^+ (Judy *et al.*, 2015)

A nivel ultraestructural, los estudios han revelado la acumulación de NPs de Ag en los orgánulos celulares como en las vacuolas de *Oriza sativa* (Mazumdar y Ahmed, 2011), células de la raíz de *Brassica campestris* (Mazumdar, 2014; Geisler-Lee *et al.*, 2014), así como en los

plasmodesmos, la pared celular y la laminilla media de células de la raíz de *Arabidopsis* (Geisler-Lee *et al.*, 2012). Cabe resaltar que Cvjetko *et al.* (2017) encontraron Ag en las células de la punta de la raíz y a la vez estas células estaban altamente vacuoladas, sugiriendo a las vacuolas como principales orgánulos de almacenamiento de Ag.

Por lo tanto, la acumulación de NPs de Ag en la raíz de *T. repens* ejercieron influencias negativas en el crecimiento de las plantas como se muestran en las variables analizadas en este estudio.

Algunos reportes mencionan que los HMA incrementan la absorción de metales en sus plantas hospederas, pero otros estudios reportan un efecto protector, disminuyendo la absorción del metal e incrementando la tolerancia en las plantas a estos elementos (González Chávez *et al* 2007). Esta discrepancia puede deberse al tipo de hongo y especie utilizados (González Chávez *et al.*, 2008). Existe información suficiente de la función protectora de los HMA ante metales, sin embargo es importante considerar que las NPs, exhiben propiedades diferentes al metal origen, el tamaño y forma son propiedades importantes por el cual pueden entrar al interior de las plantas y provocar efectos adversos a nivel celular. En los factores que reducen la disponibilidad y el riesgo de toxicidad de los metales, se encuentra la función la glomalina, una proteína que producen todos los hongos arbusculares, puede estabilizar los metales pesados en el suelo (González Chávez *et al.*, 2004b)

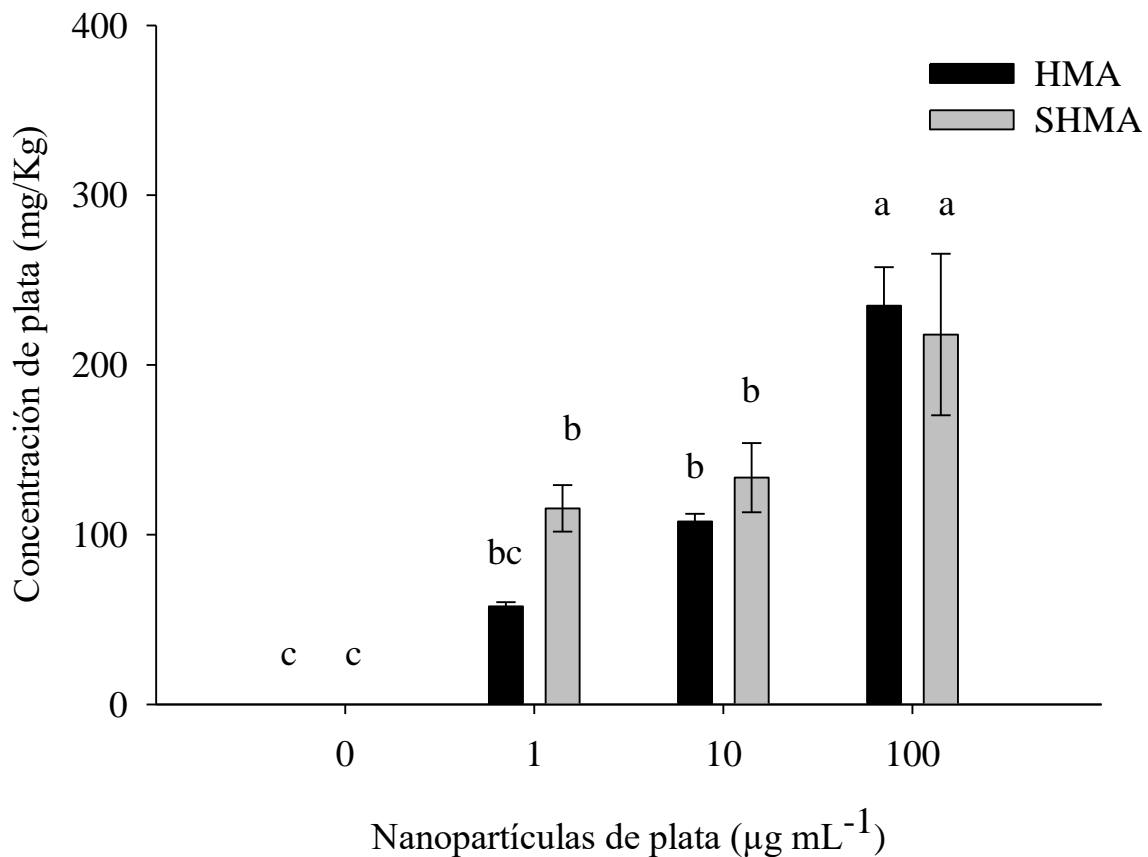


Figura 16. Efecto de las NPs de Ag en la concentración de plata presente en el tejido radical de *Trifolium repens* inoculadas con *Rhizophagus intraradices* (HMA), Media \pm error estándar, n=3. Letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). Significancia: Factor HMA= 0.0489, factor NPs de Ag=0.0001, e interacción HMA-NPsAg=0.0413. Se encontró interacción entre HMA-NPsAg en el diámetro de vasos, por lo que se fijó el factor inoculación y se comparó con cada nivel de concentración

Se ha mencionado la importancia de la inoculación de HMA en suelos contaminados por metales pesados (MP). El beneficio que se ha encontrado que los HMA aportan a las plantas en estas condiciones se relaciona con el mejor crecimiento propiciado por el mejoramiento de la nutrición de la planta (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2016), así como los HMA utilizan estrategias para

tolerar MP, como la inmovilización de los metales mediante la secreción de compuestos, la precipitación en gránulos de polifosfato, la adsorción a la pared del hongo y la quelatación de los metales dentro del tejido del hongo (Gaur y Adholeya, 2004). Esto no es claro en la presente investigación ya que nuestros resultados indican que los HMA no presentaron un efecto protector significativo en la acumulación de Ag en el tejido de *T. repens*. En general los resultados demuestran que las NPs de Ag, provoca daños en el trébol blanco, a concentraciones elevadas (100 mg kg^{-1}) con la presencia o sin la presencia de *R. intraradices*.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se sintetizaron NPs de Ag de tamaño promedio de 21.61 ± 0.44 nm, forma cuasi esférica con un índice de redondez de 0.85 ± 0.005 .

La simbiosis micorrízica arbuscular *Rhizophagus intraradices* y *Trifolium repens*, puede establecerse en presencia de NPs de Ag, pero se reduce en concentraciones de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs de Ag aplicadas al sustrato.

Se presentó el efecto dosis-respuesta hormético, en el que a bajas concentraciones de NPs de Ag incrementaron la colonización micorrízica arbuscular (1 y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$), el número de esporas ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), la biomasa seca de vástago y el área foliar (SHMA) (1 y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

En plantas con y sin HMA la concentración a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, promovió la reducción en: porcentaje de colonización y número de esporas; la biomasa fresca y seca de vástago, la biomasa fresca de raíz; el área foliar y fluorescencia de la clorofila.

La estructura secundaria interna de la raíz de trébol blanco no se modifica por la exposición a NPs de Ag, excepto por el número y diámetro de vasos de xilema; en contraste, la estructura externa, en particular la pubescencia radical fue afectada por la presencia de las NPs.

La acumulación de Ag en el tejido radical de *Trifolium repens* L. no se reduce por la presencia de HMA, la concentración en el tejido aumenta en función de la concentración de NPs Ag aplicada.

Se concluye que la presencia de *Rhizophagus intraradices*, no atenúa los efectos negativos de las NPs de Ag cuando *T. repens* se expone a altas concentraciones de NPs de Ag ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), por el contrario, bajas concentraciones de NPs de Ag ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) promueven el crecimiento.

7. LITERATURA CITADA

- Abd-Alla, M., Nafady, N., & Khalaf, D. (2016). Assessment of silver nanoparticles contamination on faba bean-*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*-*Glomus aggregatum* symbiosis: Implications for induction of autophagy process in root nodule. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 218, 163-177. doi: 10.1016/j.agee.2015.11.022
- Ávalos, A., Haza, A., & Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense De Ciencias Veterinarias*, 7(2). doi: 10.5209/revrccv2013.v7n2.43408
- Bago, B., Pfeffer, P., & Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124(3), 949-958. doi: 10.1104/pp.124.3.949
- Baker, N. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review Plant Biology*, 59, 89-113. doi:10.1146/annurevplant.59.032607.092759
- Barker, S. J., Tagu, D., & Delp, G. (1998). Regulation of Root and Fungal Morphogenesis in Mycorrhizal Symbioses. *Plant Physiology*, 116(4), 1201-1207. doi: 10.1104/pp.116.4.1201
- Barrena, R., Casals, E., Colón, J., Font, X., Sánchez, A., & Puntès, V. (2009). Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, 75(7), 850-857. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.078
- Bello-Bello, J. J., Chavez-Santoscoy, R., Lecona-Guzmán, C., Bogdanchikova, N., Salinas-Ruíz, J., Gómez-Merino, F. C., & Pestryakov, A. (2017). Hormetic Response by Silver Nanoparticles on In Vitro Multiplication of Sugarcane (*Saccharum* spp. Cv. Mex 69-290) Using a Temporary Immersion System. *Dose-Response*, 15(4), 155932581774494. doi: 10.1177/1559325817744945
- Blanco, E., Hsiao, A., Mann, A.P., Landry, M.G., Meric, F. & Ferrai M. (2011). Nanomedicine in cáncer Therapy: Innovartive trends and prospects. *Cancer Science*, 102(7), 1247-1252.

- Calabrese, E. (2013). Biphasic dose responses in biology, toxicology and medicine: Accounting for their generalizability and quantitative features. *Environmental Pollution*, 182, 452-460. doi: 10.1016/j.envpol.2013.07.046
- Carrillo-González, R., González-Chávez, M. C., & López-Luna, J. (2013) David contra Goliat: La nanotecnología en la limpieza del ambiente. *Agro Productividad*, 36(4), 4-8.
- Carrillo-López, L., Zavaleta-Mancera, H. A., Vilchis-Nestor, A., Soto-Hernández, R. M., Arenas-Alatorre, J., Trejo-Téllez, L. I., & Gómez-Merino, F. C. (2014). Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Chenopodium ambrosioides*. *Journal Of Nanomaterials*, 2014, 1-9. doi: 10.1155/2014/951746
- Cerpa, A., Kober, M., Calle, D., Negri, V., Gavira, J. M., Hernanz, A., Briones, F., Cerdán, S.P. & Ballesteros P. (2013). Single-walled carbón nanotubes as anisotropic relaxation probes for magnetic resonance imaging. *Medicinal Chemistry Communications*, 4, 669-672.
- Choi, O., y Hu, Z. (2008). Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environment Science Technology*, 42: 4583-4588.
- Cornejo, P., Pérez-Tienda, J., Meier, S., Valderas, A., Borie, F., Azcón-Aguilar, C., & Ferrol, N. (2013). Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Soil Biology And Biochemistry*, 57, 925-928. doi: 10.1016/j.soilbio.2012.10.031
- Cvjetko, P., Zovko, M., Štefanić, P. P, Biba, R., Tkalec, M., Domijan, A. M., Vrček, I. V., Letofsky-Papst, I., Šikić, S. & Balen, B. (2017). Phytotoxic effects of silver nanoparticles in tobacco plants. *Environmental Science And Pollution Research*, 25(6), 5590-5602. doi: 10.1007/s11356-017-0928-8
- Di Benedetto, A., & Tognetti, J. (2016). Técnicas de análisis de crecimiento de plantas: su aplicación a cultivos intensivos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 42(3), 258-282.
- Díaz del Castillo, R. F. (2012). Introducción a los nanomateriales. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM). 1-79 pp.

- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Latta, D. E., Manangón, E. Britt, D. W., Johnson, P., Boyanov M. I., & Anderson, A. J. (2012). CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal Nanoparticles Research*, 14, 1125. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1125-9>
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Martineau, N., Britt, D. W., Haverkamp, R., & Anderson, A. J. (2013). Silver Nanoparticles Disrupt Wheat (*Triticum aestivum* L.) Growth in a Sand Matrix. *Environmental Science and Technology*, 47(2), 1082-1090. doi: 10.1021/es302973y
- Dubchak, S., Ogar, A., Mietelski, J. w., & Turnau, K. (2010). Influence of silver and titanium nanoparticles on arbuscular mycorrhiza colonization and accumulation of radiocaesium in *Helianthus annuus*. *Spanish Journal Of Agricultural Research*, 8(S1), 103. doi: 10.5424/sjar/201008s1-1228
- Fan, X., Chang, W., Feng, F., & Song, F. (2018). Responses of photosynthesis-related parameters and chloroplast ultrastructure to atrazine in alfalfa (*Medicago sativa* L.) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 166, 102-108. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.09.030
- Feng, Y., Cui, X., He, S., Dong, G., Chen, M., Wang, J., & Lin, X. (2013). The Role of Metal Nanoparticles in Influencing Arbuscular Mycorrhizal Fungi Effects on Plant Growth. *Environmental Science and Technology*, 47(16), 9496-9504. doi: 10.1021/es402109n
- Ferrera-Cerrato, R., A., Alarcón, J., Delgadillo-Martínez, J. J., Almaraz-Suárez y J., Pérez-Moreno. 2016. Los microorganismos rizosféricos y su impacto en la nutrición vegetal. pp 423-443. En: Alcántar-González, G., L. I., Trejo-Téllez & F. C., Gómez-Merino. Nutrición de cultivos. Biblioteca Básica de Agricultura. 2da edición.
- Gardner, F. P., Pearce, R.B. & Mitchell R. L. (1985). Physiology of crop plants. Iowa State University Press, USA. 325 pp.
- Gaur, A. & Adholeya, A. (2004). Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science*, 86, 528-534.

- Geisler-Lee, J., Wang, Q., Yao, Y., Zhang, W., Geisler, M., & Li, K., Ma, X. (2012). Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology*, 7(3), 323-337. doi: 10.3109/17435390.2012.658094
- Gerdemann, J., & Nicolson, T. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions Of The British Mycological Society*, 46(2), 235-244. doi: 10.1016/s0007-1536(63)80079-0
- González-Chávez, M. C. (2008). Herramientas metodológicas para el estudio de hongos arbusculares en suelos contaminados con metales pesados. pp.135-147. En Álvarez-Sánchez, J. A. & Monroy, A. Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración.
- González-Chávez, M. C., Alarcón, A., & Ferrera-Cerrato R. (2007). Manual de métodos para la investigación y aplicación de Hongos Micorrízicos Arbusculares en laboratorio y campo. Ecología de la raíz. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. 153 p.
- González-Chávez, M. C., Carrillo-González, R., Wright S. F. & Nichols K. (2004b). The role of Glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution* 130: 317-323
- González-Chávez, M. C., Gutiérrez-Castorena, M. C. y Wright, S. (2004a). Hongos micorrízicos arbusculares en la agregación del suelo y sustentabilidad. *Terra Latinoamericana* 22, 507-514.
- González, M. S., Perales, V. H. & Salcedo, A. M. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4), 119-129
- Hatami, M., Kariman, K., & Ghorbanpour, M. (2016). Engineered nanomaterial-mediated changes in the metabolism of terrestrial plants. *Science Of The Total Environment*, 571, 275-291. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.184
- Hay, M J., Dunlop, J. & Hopcroft, D. H. (1986). Phosphate uptake and anatomy of unthickened and secondarily thickened adventitious roots of field-grown white clover (*Trifolium repens* L.). *New Phytology*, 103, 659-668

- Hernández, N., Soto, F., & Plana, R. (2015). Growth performance and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) on three planting dates. *Cultivos Tropicales*, 36(1), 83-88.
- Hernando-Grande, A. (2007). Nanotecnología y nanopartículas magnéticas: La Física actual en lucha contra la enfermedad. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 101(2), 321-327
- Hewitt, E.J. 1996. The composition of the nutrient solution. En Hewitt, E. J. (ed), *Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition*. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham U. K. pág. 187-246
- Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., & Yang, X., Wang, H., Wang, Y., Shao, W., He, N., Hong, J. & Chen, C. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*, 18(10), 105104. doi: 10.1088/0957-4484/18/10/105104
- Ider, M., Abderrafi, K., Eddahbi, A., Ouaskit, S., & Kassiba, A. (2016). Rapid Synthesis of Silver Nanoparticles by Microwave-Polyol Method with the Assistance of Latex Copolymer. *Journal Of Cluster Science*, 28(3), 1025-1040. doi: 10.1007/s10876-016-1096-6
- Imlay, J., & Linn, S. (1988). DNA damage to DNA and oxygen radical toxicity. *Science (Washington)*, 240, 1302 -1309. doi: doi: 10.1126 / science.3287616
- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13, 2638–2650
- Jenkins, W. R. (1964). ‘A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil’. *Plant Disease Reporter*, 48(9), 662–665.
- Jhanzab, H. M., Razzaq, A., Jilani, G., Rehman, A., Hafeez, A., & Yasmeen, F. (2015). Silver nanoparticles enhance the growth, yield and nutrient use efficiency of wheat. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 7(1), 15–22.
- Judy, J., Kirby, J., Creamer, C., McLaughlin, M., Fiebiger, C., & Wright, C., Bertsch, P. M. (2015). Effects of silver sulfide nanomaterials on mycorrhizal colonization of tomato plants and soil microbial communities in biosolid-amended soil. *Environmental Pollution*, 206, 256-263. doi:

10.1016/j.envpol.2015.07.002

- Kaye, J. P., McCulley, R. L., & Burke, I. C. (2005). Carbon fluxes, nitrogen cycling, and soil microbial communities in adjacent urban, native and agricultural ecosystems. *Global Change Biology*, 11(4), 575-587. doi: 10.1111/j.1365-2486.2005.00921x
- Krishnaraj, C., Jagan, E., Ramachandran, R., Abirami, S., Mohan, N., & Kalaichelvan, P. (2012). Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochemistry*, 47(4), 651-658. doi: 10.1016/j.procbio.2012.01.006
- Kru, G. H. (1997). Environmental Influences on Development Growth and Yield. pp. 101-180. In: Wien, H.C. (ed.) *The physiology of vegetable crops*. CABI Publishing, London.
- Kumar, H., Venkatesh, N., Bhowmik, H., & Kuila, A. (2018). Metallic Nanoparticle: A Review. *Biomedical Journal Of Scientific & Technical Research*, 4(2). doi: 10.26717/bjstr.2018.04.0001011
- Küpper, H., Šetlík, I., Spiller, M., Küpper, F., & Prášil, O. (2002). Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *Journal Of Phycology*, 38(3), 429-441. doi: 10.1046/j.1529-8817.2002.01148x
- Lee, W., Kwak, J., & An, Y. (2012). Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere*, 86(5), 491-499. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.10.013
- Li, C. C., Dang, F., Li, M., Zhu, M., Zhong, H., Hintelmann, H. & Zhou, D. M. (2017). Effects of exposure pathways on the accumulation and phytotoxicity of silver nanoparticles in soybean and rice. *Nanotoxicology*, 11(5), 699-709. doi.org/10.1080/17435390.2017.1344740
- Loo, Y. Y., Chieng, B. W., Nishibuchi, M. & Radu, S. (2012). Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia Sinensis*. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4263-4267.
- Loomba, L., & Scarabelli, T. (2013). Metallic nanoparticles and their medicinal potential. Part II: aluminosilicates, nanobiomagnets, quantum dots and cochleates. *Therapeutic Delivery*, 4(9), 1179-1196. doi: 10.4155/tde.13.74

- Ma X., Wang Q., Rossi L., Zhang W. (2015). Cerium oxide nanoparticles and bulk cerium oxide leading to different physiological and biochemical responses in *Brassica rapa*. *Environmental Science. Technology*, 10.1021/acs.est.5b04111
- Marchiol, L., Mattiello, A., Pošćić, F., Giordano, C., & Musetti, R. (2014). In vivo synthesis of nanomaterials in plants: location of silver nanoparticles and plant metabolism. *Nanoscale Research Letters*, 9(1). doi: 10.1186/1556-276x-9-101
- Maxwell, K., & Johnson, G. (2000). Chlorophyll fluorescence a practical guide. *Journal Of Experimental Botany*, 51(345), 659-668. doi: 10.1093/jxb/51.345.659
- Mazumdar, H. & Ahmed, G. U. (2011) Phytotoxicity effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa*. *International Journal of Chemistry Technology Research*, 3(3),1494-1500.
- Mazumdar, H. (2014) Toxicological effects of silver nanoparticles in selected crop plants. *International Journal of Research in Chemistry and Environmental*, 4(3), 101-106.
- Medina, C., Santos-Martínez, M.J., Radomski, A., Corrigan, O.I. & Radomski M. W. (2007). Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology*, 150, 552-558.
- Miransari, M. (2010). Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant Biology*. 12, 563-569doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00308x
- Mody, V., Siwale, R., Singh, A., & Mody, H. (2010). Introduction to metallic nanoparticles. *Journal Of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 2(4), 282. doi: 10.4103/0975-7406.72127
- Murchie, E., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal Of Experimental Botany*, 64(13), 3983-3998. doi: 10.1093/jxb/ert208
- Noori, A., White, J. C., & Newman, L. A. (2017). Mycorrhizal fungi influence on silver uptake and membrane protein gene expression following silver nanoparticle exposure. *Journal Of Nanoparticle Research*, 19(2). doi: 10.1007/s11051-016-3650-4
- Olsson, P. A., Hammer, E. C., Pallon, J., van Aarle, I. M., & Wallander, H. (2011). Elemental

- composition in vesicles of an arbuscular mycorrhizal fungus, as revealed by PIXE analysis. *Fungal Biology*, 115(7), 643-648. doi: 10.1016/j.funbio.2011.03.008
- Orchard, S., Standish, R. J., Nicol, D., Dickie, I., & Ryan, M. (2017). Sample storage conditions alter colonisation structures of arbuscular mycorrhizal fungi and, particularly, fine root endophyte. *Plant And Soil*, 412(1-2), 35-42. doi: 10.1007/s11104-016-2867-4
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763-775. doi: 10.1038/nrmicro1987
- Peterson, L., Massicote, H. & Melville, L. (2004). *Mycorrhizas: Anatomy and cell biology*. Ottawa: NRC Research Press.
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions Of The British Mycological Society*, 55(1), 158-168. doi: 10.1016/s0007-1536(70)80110-3
- Poschenrieder, C., Cabot, C., Martos, S., Gallego, B., & Barceló, J. (2013). Do toxic ions induce hormesis in plants?. *Plant Science*, 212, 15-25. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.07.012
- Regvar, M., Groznik, N., Goljevšček, N. & Gogala N. (2001). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi at various differentially managed ecosystems in *Slovenia*. *Acta Biology of Slovenia*, 44, 27-34
- Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J., & Gardea-Torresdey, J. L. (2011). Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 59(8), 3485-3498. doi: 10.1021/jf104517j
- Rillig, M. (2004). Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal Of Soil Science*, 84(4), 355-363. doi: 10.4141/s04-003
- Ruíz-Lozano, J. M., Azcón, R., Gómez, M. (1995). Effects of arbuscular mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 456-460
- Ruzin, S. (2000). *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, 322 pp. ISBN 0-19-508956-1.

- Rzedowski, G. C. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México
- Santos, M. C., Segura, M. A., & Núñez, C. L. (2010). Análisis de Crecimiento y Relación Fuente-Demanda de Cuatro Variedades de Papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Municipio de Zipaquirá (Cundinamarca, Colombia). *Revista Facultad Nacional De Agronomía Medellín*, 63(1), 5253-5266.
- Siani, N. G., Fallah, S., Pokhrel, L. R., & Rostamnejadi, A. (2017). Natural amelioration of Zinc oxide nanoparticle toxicity in fenugreek (*Trigonella foenum-gracum*) by arbuscular mycorrhizal (*Glomus intraradices*) secretion of glomalin. *Plant Physiology And Biochemistry*, 112, 227-238. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.01.001
- Sillen, W., Thijs, S., Abbamondi, G., Janssen, J., Weyens, N., White, J., & Vangronsveld, J. (2015). Effects of silver nanoparticles on soil microorganisms and maize biomass are linked in the rhizosphere. *Soil Biology And Biochemistry*, 91, 14-22. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.08.019
- Smith, S. E. & Read, D. J. (2008). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, New York.
- Spinoso-Castillo, J. L., Chavez-Santoscoy, R. A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J. A., Morales-Ramos, V., & Bello-Bello, J. J. (2017). Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture*, 129(2), 195-207. doi: 10.1007/s11240-017-1169-8
- Tran, Q. H., Nguyen, V. Q., & Le, A. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances In Natural Sciences: Nanoscience And Nanotechnology*, 4(3), 033001. doi: 10.1088/2043-6262/4/3/033001
- Vicencio-Salas, S. C., Zavaleta-Mancera, H. A., Arévalo, M. L. G., Carrillo-López, L. M. & Luna-Cabazos M. (2018). Sacarosa y ácido cítrico en soluciones con nanopartículas de plata, en la vida florero de rosa. *Agrociencia*, 52, 951-965.
- Vilchis-Nestor, A., Sánchez-Mendieta, V., Camacho-López, M., Gómez-Espinosa, R., Camacho-López, M., & Arenas-Alatorre, J. (2008). Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. *Materials Letters*, 62(17-18), 3103-3105. doi:

10.1016/j.matlet.2008.01.138

- Wang, F., Lin, X., Yin, R., & Wu, L. (2006). Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on the growth of *Elsholtzia splendens* and *Zea mays* and the activities of phosphatase and urease in a multi-metal-contaminated soil under unsterilized conditions. *Applied Soil Ecology*, *31*(1-2), 110-119. doi: 10.1016/j.apsoil.2005.03.002
- Wang, F., Adams, C. A., Shi, Z., & Sun, Y. (2018). Combined effects of ZnO NPs and Cd on sweet sorghum as influenced by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Chemosphere*, *209*, 421-429. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.06.099
- Wang, F., Liu, X., Shi, Z., Tong, R., Adams, C., & Shi, X. (2016). Arbuscular mycorrhizae alleviate negative effects of zinc oxide nanoparticle and zinc accumulation in maize plants – A soil microcosm experiment. *Chemosphere*, *147*, 88-97. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.12.076
- Wang, Z., Wang, J., & Qi, H. (2014). Responses of maximum photosystem II photochemical efficiency of phytoplankton communities to nutrient limitation in the coastal sea of Qingdao, China. *Journal Of Ocean University Of China*, *13*(1), 83-90. doi: 10.1007/s11802-014-2236-y
- Weiersbye, I. M., Straker, C. J., & Przybylowicz, W. J. (1999). Micro-PIXE mapping of elemental distribution in arbuscular mycorrhizal roots of the grass, *Cynodon dactylon*, from gold and uranium mine tailings. *Nuclear Instruments And Methods In Physics Research Section B: Beam Interactions With Materials And Atoms*, *158*(1-4), 335-343. doi: 10.1016/s0168-583x(99)00467-x
- Wu, F. Y., Bi, Y. L., Leung, H. M., Ye, Z. H., Lin, X. G., & Wong, M. H. (2010). Accumulation of As, Pb, Zn, Cd and Cu and arbuscular mycorrhizal status in populations of *Cynodon dactylon* grown on metal-contaminated soils. *Applied Soil Ecology*, *44*(3), 213-218. doi: 10.1016/j.apsoil.2009.12.008
- Yang, Y., Han, X., Liang, Y., Ghosh, A., Chen, J., & Tang, M. (2015). The Combined Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) and Lead (Pb) Stress on Pb Accumulation, Plant Growth Parameters, Photosynthesis, and Antioxidant Enzymes in *Robinia pseudoacacia* L. *PLoS ONE*, *10*(12), e0145726. doi: 10.1371/journal.pone.0145726

Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B., Auffan, M., & Wiesner, M. et al. (2011). More than the Ions: The Effects of Silver Nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science & Technology*, 45(6), 2360-2367. doi: 10.1021/es103995x

Zavaleta-Mancera, H. A., Vilchis-Nestor, A. R., López-Carrillo, L.M., Arenas-Alatorre, J., Hanako-Rosas, G. & Crosby-Galván, M. M. (2013). La nanociencia y la nanotecnología: Herramientas para medir lo diminuto. *Agroproductividad*, (6)4,15-23.