



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

Evaluación de la capacidad antimicrobiana de péptidos de plantas y nanopartículas de plata de síntesis verde y su efecto en el desarrollo de cactáceas *in vitro*.

**PRESENTA
LILIANA MERCADO DÍAZ DE LEÓN**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

CO TUTORES

Dr. José Francisco Morales Domínguez

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch

ASESOR

Dr. Abraham Loera Muro

Aguascalientes, Ags., junio 2024

AUTORIZACIONES



M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **TUTOR** designado del estudiante **LILIANA MERCADO DÍAZ DE LEÓN** con ID **97427** quien realizó la tesis titulada: **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE PÉPTIDOS DE PLANTAS Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA DE SÍNTESIS VERDE Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO DE CACTÁCEAS IN VITRO**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 31 de mayo de 2024.



Dr. José Francisco Morales Domínguez
Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19

CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **CO-TUTOR** designado del estudiante **LILIANA MERCADO DÍAZ DE LEÓN** con ID **97427** quien realizó la tesis titulada: **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE PÉPTIDOS DE PLANTAS Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA DE SÍNTESIS VERDE Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO DE CACTÁCEAS IN VITRO**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 31 de mayo de 2024.



Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch
Co-Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emission: 17/05/19

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **LILIANA MERCADO DÍAZ DE LEÓN** con ID **97427** quien realizó la tesis titulada: **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE PÉPTIDOS DE PLANTAS Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA DE SÍNTESIS VERDE Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO DE CACTÁCEAS IN VITRO**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 31 de mayo de 2024.

Dr. Abraham Loera Muro
Co-Tutor de tesis

El nombre completo que aparece en el Voto Aprobatorio debe coincidir con el que aparece en el documento pdf. No se puede abreviar, ni omitir caracteres

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 06/06/2024

NOMBRE: Liliana Mercado Díaz de León **ID** 97427

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Tradicional **LGAC (del posgrado):** Biotecnología y Bioquímica Vegetal y Animal

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: Evaluación de la capacidad antimicrobiana de péptidos de plantas y nanopartículas de plata de síntesis verde y su efecto en el desarrollo de cactáceas *in vitro*

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Contribuye al cuidado y preservación de especies cactáceas *in vitro*, como *Mammillaria bombycina* y *Hylocereus undatus*

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:				
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:				
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
<i>NO</i>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Coincide con el título y objetivo registrado
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene congruencia con cuerpos académicos
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene el CVU del Conacyt actualizado
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados				
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El estudiante es el primer autor
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

Sí X
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Dra. Lucía Isabel Chávez Ortiz

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Dr. Gilberto Alejandro Padilla Díaz

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asistido por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Dr. Alejandro Padilla Díaz

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. Jorge Martín Alfárez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.



Effect of *BvAgNP* on growth, development, and glyoxalase gene expression analysis in *Mammillaria bombycina* and *Selenicereus undatus*

Liliana Mercado-Díaz de León¹ · Cristina Garcidueñas-Piña² · Eugenio Pérez-Molphe-Balch¹ · Abraham Loera-Muro³ · José Francisco Morales-Domínguez¹

Received: 10 November 2023 / Accepted: 19 April 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2024

Abstract

Background Silver nanoparticles (AgNPs) have been used in plant tissue culture as growth stimulants, promoting bud initiation, germination, and rooting. In prior studies, AgNPs were synthesized and characterized by green synthesis using extracts from *Beta vulgaris* var. *cicla* (*BvAgNP*), and their functionality as seed disinfectant and antimicrobial was verified. In this study, we evaluated the effect of *BvAgNP* on the growth and development of *Mammillaria bombycina* and *Selenicereus undatus* *in vitro*, as well as the expression of glyoxalase genes.

Methods Explants from *M. bombycina* and *S. undatus* *in vitro* were treated with 25, 50, and 100 mg/L of *BvAgNP*. After 90 days, morphological characteristics were evaluated, and the expression of glyoxalase genes was analyzed by qPCR.

Results All treatments inhibited rooting for *M. bombycina* and no bud initiation was observed. *S. undatus*, showed a maximum response in rooting and bud generation at 25 mg/L of *BvAgNP*. Scanning electron microscopy (SEM) results exhibited a higher number of vacuoles in stem cells treated with *BvAgNP* compared to the control for both species. Expression of glyoxalase genes in *M. bombycina* increased in all treatments, whereas it decreased for *S. undatus*, however, increasing in roots.

Conclusions This study presents the effects of *BvAgNP* on the growth and development of *M. bombycina* and *S. undatus*, with the aim of proposing treatments that promote *in vitro* rooting and bud initiation.

Keywords Silver nanoparticles · Green synthesis · Cacti · Glyoxalases · qPCR

Abbreviations

NP Nanoparticles
AgNPs Silver nanoparticles
BvAgNP AgNP by green synthesis with chard extracts from *Beta vulgaris* var. *cicla*

Gly DJ1 Glyoxalase III gen
MS Murashige & Skoog culture medium
ROS Reactive oxygen species
SEM Scanning Electron Microscopy
EDS Energy-dispersive X-ray spectroscopy

José Francisco Morales-Domínguez
francisco.morales@edu.uaa.mx

¹ Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Fracc. C.U., Aguascalientes C.P. 20100, México

² Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Fracc. C.U., Aguascalientes C.P. 20100, México

³ CONAHCYT, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz C.P. 23096, México

Introduction

Silver nanoparticles (AgNPs) have made significant advances in various fields of science. Their synthesis can be either chemical or green. However, green synthesis is emerging as an alternative to minimize the toxic waste produced after the reaction. This method uses organic materials from plants, bacteria or fungi as reducing and stabilizing agents. Then, the resulting NPs show a greater ability to interact with living organisms due to their organic coating. It is also a simple and economical synthesis method [1–3].

AGRADECIMIENTOS

A mi muy querida Universidad Autónoma de Aguascalientes por la beca provisional otorgada. Y al CONAHCYT por la beca otorgada (765327).

A mi tutor el Dr. José Francisco Morales Domínguez, por su orientación, apoyo, enseñanzas y la confianza que me dio dejándome trabajar en el laboratorio 60 tanto tiempo.

A mi co-tutor el Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch, por todo su apoyo, conocimiento y guiarme de manera muy acertada. Siempre le tendré agradecimiento y admiración.

A mi asesor el Dr. Abraham Loera Muro, por su apoyo, paciencia y su valiosísima orientación que me obligó a mejorar.

A todas las personas del lab 60 por su amistad y compañerismo. Al MC Daniel por su invaluable ayuda, apoyo y amistad cada día. A Mariana y Caro por el camino que me dejaron. A mis compañeras de Doctorado Vicky y Luisa y a todos los chicos de licenciatura por su amistad y hacer divertidos los días en el 60. A todos mis alumnos de Tesina y mini proyecto por su paciencia y motivación.

A todos del laboratorio 207, Dr. Isaac, Dra. Luci, Vicky, Adilene, por ser tan amables, confiar en mí y darme tanto apoyo siempre. A la Dra Cristina Garcidueñas por sus asesorías y permitirme trabajar con las BvAgNP. Al Dr. Mario Arzate por tantas preguntas que me respondió, al Dr. Roberto Carlos y la Dra. Ana Laura por todas sus asesorías.

Para todas las personas de otros laboratorios que me ayudaron desinteresadamente; A la MC Rocío por ayudarme cuando más lo necesitaba y abrirme tantas puertas. A los laboratorios de biología y microbiología, a Betty por su amable ayuda. A la Dra. Consolación, a Sonia y a la Dra. Raquel gracias infinitas por todas sus enseñanzas y permitirme trabajar en sus laboratorios. Al Mtro Duque, Carmelita y todos los Doctores que nos prestaron su equipo instrumental. Al MC Hugo y los encargados del invernadero de biología por su confianza.

A Mony la asistente de Doctorado, por toda su atención y amabilidad, por resolverme tantas dudas y sacarme de problemas durante este proceso.

Y principalmente a mi querida familia. A mis padres, por su eterno apoyo y cariño. A mis hermanos, mi prometido y mi cuñado, a todos por siempre estar conmigo. No puedo plasmar aquí todo lo que les agradezco y todo lo que les debo.

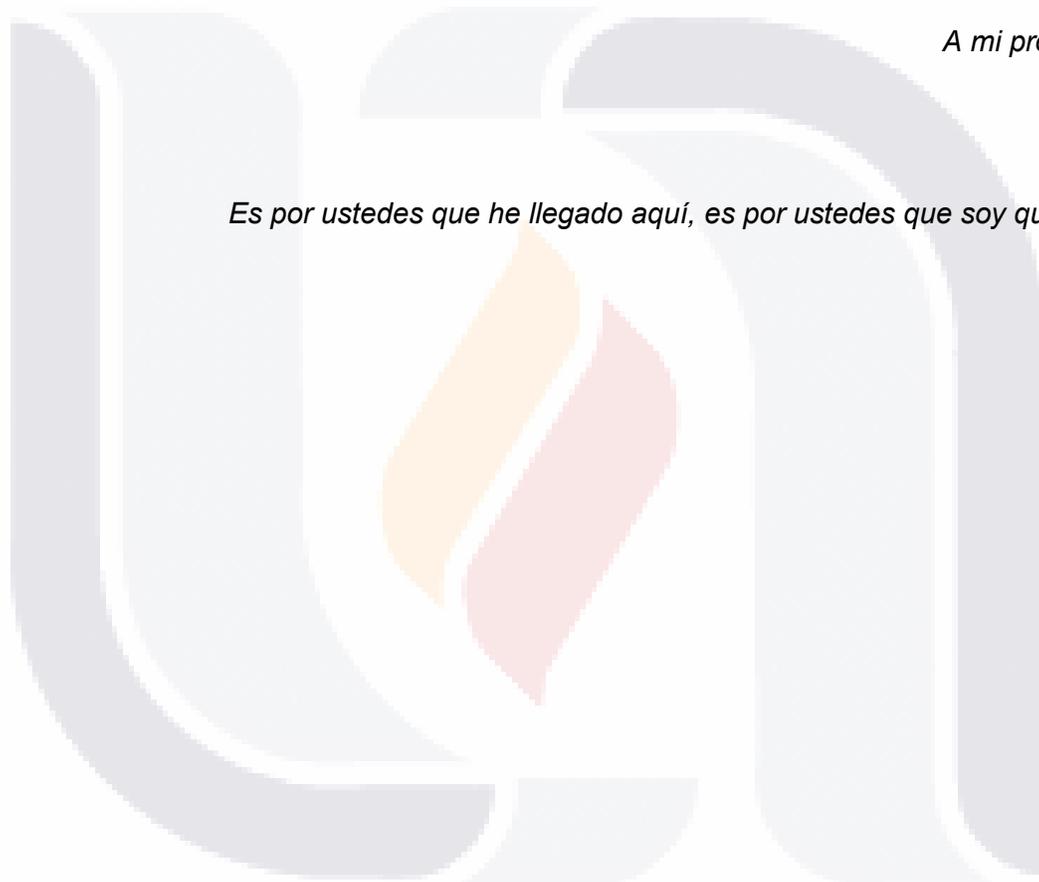
DEDICATORIAS

A mis padres.

A mis hermanos.

A mi prometido.

Es por ustedes que he llegado aquí, es por ustedes que soy quien soy.



1.4.2 <i>Hylocereus undatus</i>	32
1.5 Sistema glioxalasa	33
1.5.1 Metilglioxal	34
1.5.2 Sistema glioxalasa en plantas	35
2. JUSTIFICACIÓN	36
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVOS	37
4.1 OBJETIVO GENERAL	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5. MATERIALES Y MÉTODOS	38
5.1 Péptidos sintéticos antimicrobiano proveniente de glioxalasa de sorgo (<i>S. bicolor</i>)	38
5.1.1 Ligación de los genes sintéticos al vector pGEM® T-Easy	38
5.1.2 Transformación genética de <i>E. coli</i> DH5α por choque térmico	38
5.1.3 Extracción de plásmidos	39
5.1.4 Verificación de la ligación mediante restricción con <i>HindIII</i> y <i>BamHI</i>	39
5.1.5 Digestión enzimática con <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i>	39
5.1.6 Ligación de los genes sintéticos al vector pET32 a(+) y transformación genética de <i>E. coli</i> BL21 Rosetta	40
5.1.7 Verificación de la ligación mediante PCR con oligonucleótidos pET 32 y pET 33. ...	40
5.1.8 Secuenciación de construcciones	40
5.1.9 Inducción y extracción de proteínas totales solubles	41
5.1.10 Cuantificación de proteínas totales solubles (PTS)	41
5.1.11 Pruebas de capacidad antimicrobiana de péptidos sintéticos	41
5.2 Obtención de material vegetal por propagación de cactáceas <i>in vitro</i>	42
5.3 Nanopartículas de plata de síntesis verde	42

5.3.1 Síntesis verde de AgNP a partir de acelga.....	42
5.3.2 Evaluación de la capacidad antimicrobiana de <i>BvAgNP</i>	43
5.3.3 Efectos de <i>BvAgNP</i> en el crecimiento y desarrollo de <i>M. bombycina</i> y <i>H. undatus in vitro</i>	49
5.3.4 Análisis de la microbiota asociada a cultivos <i>in vitro</i> de <i>M. bombycina</i> y <i>H. undatus</i> tratados con <i>BvAgNP</i>	54
5.3.5 Análisis de expresión de genes glioxalasa en <i>M. bombycina</i> y <i>H. undatus in vitro</i> tratadas con <i>BvAgNP</i>	54
5.4 Análisis estadístico.	59
6. RESULTADOS.	61
6.1 Péptidos sintéticos antimicrobiano proveniente de glioxalastas de sorgo (<i>S. bicolor</i>).	61
6.1.1 Ligación de los genes sintéticos al vector pGEM ® T-Easy y transformación genética de <i>E. coli</i> DH5α por choque térmico.	61
6.1.2 Verificación de la ligación a pGEM ®-T Easy mediante restricción con <i>HindIII</i> y <i>BamHI</i>	62
6.1.3 Ligación de los genes sintéticos al vector pET-32a (+) y transformación genética de <i>E. coli</i> DH5α por choque térmico.	63
6.1.4 Verificación de la ligación de los genes sintéticos al vector pET-32a (+) mediante PCR.	63
6.1.5 Verificación de la ligación de <i>GSUNION</i> y <i>GSLINK</i> al vector pET-32a (+) mediante secuenciación.....	64
6.1.6 Inducción de proteínas totales solubles.	66
6.1.7 Pruebas de capacidad antimicrobiana de <i>GSUNION</i> y <i>GSLINK</i>	67
6.2 Obtención de material vegetal por propagación de <i>M. bombycina</i> y <i>H. undatus in vitro</i>	69
6.3 Síntesis verde de <i>BvAgNP</i>	70
6.4 Identificación de contaminantes de <i>M. bombycina in vitro</i>	71
6.4.1 Selección de microorganismos	71

6.4.2 Análisis morfológicos de microorganismos contaminantes de *M. bombycina in vitro*.
 71

6.4.3 Identificación de microorganismos contaminantes de *M. bombycina in vitro* por
 secuenciación de 16s e ITS..... 73

6.4.4 Huella génica de *Mycobacterium bomby* y *Methylobacterium bomby* por REP-PCR.
 75

6.5 Evaluación de la capacidad antimicrobiana de *BvAgNP*. 77

6.5.1 Pruebas de inhibición de cepas de hongos conocidos con *BvAgNP*. 77

6.5.2 Efecto inhibitorio de *BvAgNP* contra *Spissiomycetes bomby*, *Mycobacterium bomby*
 y *Methylobacterium bomby*. 78

6.5.3 Pruebas de desinfección con *BvAgNP* de tejidos inoculados con *Mycobacterium*
bomby y *Methylobacterium bomby*..... 82

6.5.4 Pruebas de adaptación en suelo de *M. bombycina in vitro* inoculada con
Methylobacterium bomby. 83

6.6 Evaluación del efecto de *BvAgNP* en el crecimiento y desarrollo de *M. bombycina*
 y *H. undatus in vitro*. 85

6.6.1 Efecto en el crecimiento y desarrollo de *H. undatus in vitro* con *BvAgNP* a altas
 concentraciones..... 85

6.6.2 Tratamientos de *BvAgNP* en *M. bombycina* y *H. undatus in vitro*..... 89

6.7 Análisis de la microbiota asociada a cultivos *in vitro* de *M. bombycina* y *H. undatus*
 tratados con *BvAgNP*. 102

6.7.1 Cuantificación de microorganismos por cuenta viable de *M. bombycina* y *H.*
undatus in vitro tratadas con *BvAgNP*..... 102

6.8 Análisis de expresión de genes glioxalasa de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro*
 tratadas con *BvAgNP*. 103

6.8.1 Identificación de genes glioxalasa en *H. undatus*..... 103

6.8.2 Identificación *in silico* de genes glioxalasa en *H. undatus*. 104

6.8.3 Diseño *in silico* de oligonucléotidos qPCR para Glioxalasa en *H. undatus*.
 107

6.8.4 Análisis de expresión mediante qPCR de glioxalasa de <i>M. bombycina</i> y <i>H. undatus</i> <i>in vitro</i> tratadas con BvAgNP.	108
7. DISCUSION.....	110
7.1 Péptidos sintéticos antimicrobiano proveniente de glioxalasa de sorgo (<i>S. bicolor</i>).	110
7.2 Aislamiento e identificación de microorganismos contaminantes de <i>M. bombycina</i> <i>in vitro</i>	111
7.3 Huella génica de <i>Mycobacterium bomby</i> y <i>Methylobacterium bomby</i>	113
7.4 Adaptación en suelo de <i>M. bombycina</i> <i>in vitro</i> inoculada con <i>Methylobacterium bomby</i>	114
7.5 Evaluación de la capacidad antimicrobiana de BvAgNP.	115
7.6 Evaluación del efecto de BvAgNP en el crecimiento y desarrollo <i>M. bombycina</i> y <i>H. undatus</i> <i>in vitro</i>	116
7.7 Análisis de la microbiota asociada a cultivos <i>in vitro</i> de <i>M. bombycina</i> y <i>H. undatus</i> tratados con BvAgNP.	121
7.8 Análisis de expresión mediante qPCR de glioxalasa de <i>M. bombycina</i> y <i>H. undatus</i> tratadas con BvAgNP.	122
8. CONCLUSIONES.....	123
9. BIBLIOGRAFIA.....	124
ANEXOS.....	133

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia y propiedades fisicoquímicas de los péptidos sintéticos GSUNION y GSLINK..... 23

Tabla 2. Programas utilizados para REP-PCR..... 46

Tabla 3. Pruebas de inhibición bacteriana con extractos de proteínas totales solubles a diferentes tiempos de exposición. 69

Tabla 4. Características morfológicas de contaminantes de cactáceas *in vitro*..... 72

Tabla 5. Análisis *in silico* de contaminantes de cactáceas *in vitro*. 73

Tabla 6. Bandeos obtenidos por REP-PCR específicos de *Methylobacterium bomby* y *Mycobacterium bomby*. 76

Tabla 7. Pruebas de inhibición radial de *Spissiomycetes bomby* con *BvAgNP* a diferentes concentraciones. 79

Tabla 8. Antibiogramas Gram positivos contra *Mycobacterium bomby*. 79

Tabla 9. Pruebas de inhibición de *Mycobacterium bomby* con *BvAgNP* a diferentes concentraciones. 80

Tabla 10. Antibiogramas Gram negativos contra *Methylobacterium bomby*..... 81

Tabla 11. Pruebas de inhibición de *Methylobacterium bomby* en *M. bombycina* con *BvAgNP* a diferentes concentraciones..... 81

Tabla 12. Características morfológicas de *M. bombycina* inoculada con *Methylobacterium bomby*. 84

Tabla 13. Efecto de altas concentraciones de *BvAgNP* en el crecimiento y desarrollo de *H. undatus in vitro* a los 90 días de exposición. 86

Tabla 14. Características morfológicas en cactáceas *in vitro* tratadas con *BvAgNP*..... 93

Tabla 15. Vacuolas en *M. bombycina* y *H. undatus* tratados con *BvAgNP*. 99

Tabla 16. Oligonucleótidos *in silico* para glioxalinas de *H. undatus*. 107

Tabla 17. Preparación de soluciones concentradas medio MS..... 133

Tabla 18. Concentración de soluciones stock para medio MS..... 134

Tabla 19. Concentración de compuestos para medio MS..... 134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Predicción *in silico* de la estructura tridimensional de péptidos sintéticos..... 24

Figura 2. Morfología de *M. bombycina*. 31

Figura 3. Morfología de *H. undatus*. 33

Figura 4. Detoxificación de MG en plantas por vía glioxalasa..... 34

Figura 5. PCR de *GSLINK* y *GSUNION* a partir de pUC57 con oligonucleótidos M13..... 61

Figura 6. Digestión enzimática con *Bam*HI y *Hind*III de genes sintéticos *GSUNION* y *GSLINK*..... 62

Figura 7. Digestión de *GSLINK* y *GSUNION* con *Eco*RI y *Hind* III..... 63

Figura 8. Ligación de genes sintéticos *GSUNION* y *GSLINK* al vector pET-32a (+). 64

Figura 9. Secuenciación de construcción PET-32a(+):*GSUNION*..... 65

Figura 10. Secuenciación de construcción PET-32a(+):*GSLINK*. 66

Figura 11. Expresión de los péptidos sintéticos *GSUNION* y *GSLINK*..... 67

Figura 12. Pruebas de inhibición bacteriana con extractos de proteínas totales solubles a diferentes tiempos de exposición. 68

Figura 13. Propagación de cactáceas *in vitro*. 70

Figura 14. Análisis de absorbancia con barrido de 300-800nm en espectrofotómetro UV visible de *BvAgNP*..... 71

Figura 15. Características morfológicas de contaminantes de cactáceas *in vitro*. 72

Figura 16. Dendrograma de identidad de Contaminante A por la región ITS..... 74

Figura 17. Dendrograma de identidad de Contaminante B por región 16S rRNA.. 74

Figura 18. Dendrograma de identidad de Contaminante C por región 16S rRNA. 75

Figura 19. Huella génica por REP-PCR de bacterias aisladas de *M. bombycina in vitro*. .76

Figura 20. Pruebas de inhibición de hongos con *BvAgNP*..... 77

Figura 21. Análisis de inhibición fúngica de *BvAgNP* a diferentes tiempos de exposición.78

Figura 22. Pruebas de inhibición de *Spissiomycetes bomby* con *BvAgNP* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. 78

Figura 23. Pruebas de inhibición de *Mycobacterium bomby* con *BvAgNP* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. 80

Figura 24. Pruebas de inhibición de *Methylobacterium bomby* con *BvAgNP* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. 81

Figura 25. Pruebas de inhibición de *Mycobacterium bomby* en *M. bombycina* cultivada en MS con *BvAgNP* a diferentes concentraciones. 82

Figura 26. Pruebas de inhibición de *Methylobacterium bomby* en *M. bombycina* cultivada en MS con BvAgNP a diferentes concentraciones..... 83

Figura 27. Pruebas de adaptación a suelo de *M. bombycina* inoculada con *Methylobacterium bomby*. 84

Figura 28. Efecto concentraciones altas de BvAgNP en el crecimiento y desarrollo de *H. undatus in vitro*. 85

Figura 29. Fotografías por MEB de raíz de *H. undatus*. 86

Figura 30. Fotografías por MEB de tallo de *H. undatus*. 87

Figura 31. Análisis MEB y EDS de tallo de *H. undatus*. 88

Figura 32. Análisis MEB y EDS de raíz de *H. undatus*. 88

Figura 33. Efecto de BvAgNP en el crecimiento y desarrollo de *M. bombycina in vitro*. ... 91

Figura 34. Explantes de *M. bombycina in vitro* tras 90 días de tratamiento con BvAgNP. 91

Figura 35. Efecto de BvAgNP en el crecimiento y desarrollo de *H. undatus in vitro*..... 92

Figura 36. Explantes de *H. undatus in vitro* tras 90 días de tratamiento con BvAgNP.. 93

Figura 37. Contenido de clorofilas en *M. bombycina* y *H. undatus* tratadas con BvAgNP. 95

Figura 38. Contenido de betalainas en *M. bombycina* y *H. undatus* tratadas con BvAgNP 96

Figura 39. Actividad Catalasa de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro* tratadas con BvAgNP.. 97

Figura 40. Micromorfología de tallo y raíz de *M. bombycina*. 98

Figura 41. Micromorfología de tallo y raíz de *H. undatus*..... 99

Figura 42. Fotografías por MEB de tallo y raíz de *M. bombycina*..... 100

Figura 43. Fotografías por MEB de tallo y raíz de *H. undatus*. 100

Figura 44. Análisis de elementos por EDS en tallo y raíz de *M. bombycina* y *H. undatus*. 101

Figura 45. Cuenta viable de microbiota asociada a *M. bombycina in vitro* tratada con BvAgNP a diferentes concentraciones. 102

Figura 46. Cuenta viable de microbiota asociada a *H. undatus in vitro* tratada con BvAgNP a diferentes concentraciones..... 103

Figura 47. Análisis *in silico* de fragmento secuenciado *HuGlyI-I*..... 104

Figura 48. Análisis *in silico* de fragmentos correspondientes a *HuGlyII* y *HuGlyDJ-I*. 105

Figura 49. Dominios de proteínas Glioxalasa en *H. undatus*. 106

Figura 50. Modelado 3D de proteínas Glioxalasa. 107

Figura 51. Análisis de expresión de genes glioxalasa en *M. bombycina* con BvAgNP.... 108

Figura 52. Análisis de expresión de genes glioxalasa en *H. undatus* con BvAgNP. 109



RESUMEN

La contaminación por microorganismos endófitos es un problema muy recurrente en el cultivo de tejidos de plantas. Esta contaminación en *Mammillaria bombycina* y *Hylocereus undatus in vitro* es muy persistente. Por lo que en este trabajo se analizó el efecto de los péptidos antimicrobianos sintéticos GSUNION y GSLINK y las nanopartículas de plata de acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*) (*BvAgNP*) en los microorganismos contaminantes en estas dos especies. Los extractos proteicos con GSUNION no tuvieron actividad contra *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa* ni *Staphylococcus aureus*, y para el extracto con GSLINK tuvo actividad contra *S. aureus*. Mediante PCR con el 16s se identificó a *Mycobacterium sp* y *Methylobacterium sp* y con ITS a *Spissiomycetes sp*, presentes en el medio de cultivo de las especies de plantas analizadas. El antibiograma mostró que *Mycobacterium sp* es sensible a rifampicina y *Methylobacterium sp* a amikacina. Las *BvAgNP* a 25 mg/L inhibieron al 100% a *Aspergillus sp.* y *Colletotrichum sp.*, al 12.29% a *Cladosporium sp.* a las 3 h, y al 100% a *Spissiomycetes sp* a los 15 min; a 50 mg/L inhibieron a *Mycobacterium sp* a 24 h y a 12.5 mg/L a *Methylobacterium sp* tras 15 min. El efecto en el crecimiento y desarrollo de *M. bombycina* y *H. undatus* con las *BvAgNP* afectaron el enraizamiento de *M. bombycina* y en *H. undatus* promovió la elongación de raíces y la brotación. A altas concentraciones de *BvAgNP* se genera la acumulación de vacuolas en el interior de células de tallo. La expresión de genes glioxalidasas en *M. bombycina* con *BvAgNP*, aumentó, mientras que para *H. undatus* disminuyó en tallo, pero aumentó en raíz. El efecto de *Methylobacterium sp* sobre el crecimiento y desarrollo de *M. bombycina* en suelo indujo engrosamiento de tallo y un mayor crecimiento que el control.

ABSTRACT

Contamination by endophytic microorganisms is a very recurrent problem in plant tissue culture. This contamination in *Mammillaria bombycina* and *Hylocereus undatus in vitro* is very persistent. Therefore, in this work, we analyze the effect of the synthetic antimicrobial peptides GSUNION and GSLINK and silver nanoparticles from chard (*Beta vulgaris* var. *cicla*) (BvAgNP) on contaminating microorganisms in these two species. The protein extracts with GSUNION had no activity against *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa* or *Staphylococcus aureus*, and the extract with GSLINK had activity against *S. aureus*. Using 16s PCR, *Mycobacterium* sp and *Methylobacterium* sp were identified, and *Spissiomycetes* sp was identified using ITS PCR, these microorganisms were found in the culture medium of the plant species analyzed. BvAgNPs at 25 mg/L inhibited the 100% of *Aspergillus* sp. and *Colletotrichum* sp., the 12.29% of *Cladosporium* sp. after 3 h, and the 100% of *Spissiomycetes bomby* after 15 min; BvAgNP at 50 mg/L inhibited *Mycobacterium bomby* after 24 h and at 12.5 mg/L inhibited *Methylobacterium bomby* after 15 min. Regarding growth and development, BvAgNPs from 25 to 100 mg/L affected the rooting of *M. bombycina*, but to *H. undatus* promoted root elongation and sprouting. At high concentrations of BvAgNP, the accumulation of vacuoles inside stem cells is generated. The glyoxalase genes expression in *M. bombycina* with BvAgNP increased, while in *H. undatus* the expression decreased in the stem but increased in the root. The effect of *Methylobacterium* sp on the growth and development of *M. bombycina* in soil induced stem thickening and greater growth than the control.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas de los cultivos de tejidos vegetales *in vitro* es la contaminación por microorganismos resistentes a métodos antimicrobianos convencionales. Muchas veces, estos microorganismos forman parte del microbiota natural de la planta en condiciones naturales, pero durante el establecimiento *in vitro* de la especie no son eliminados correctamente, convirtiéndose en contaminación latente que es muy difícil de identificar. Cuando un cultivo *in vitro* contiene microorganismos endófitos se corre el riesgo de que, al cambiar alguna condición ambiental, como pH, temperatura, características del medio, o incluso cuando se quisiera pasar la planta a suelo, la contaminación pueda manifestarse y proliferar rápidamente, lo que traería un gran riesgo en el desarrollo de la planta, pudiendo causarle deficiencias de crecimiento, síntomas de enfermedad o incluso la muerte. Además, al ser microorganismos endófitos, su aislamiento e identificación suele ser muy complicada, por lo cual es necesario el uso de métodos de identificación molecular por secuenciación de regiones específicas como la ITS y 16s, como los realizados en este trabajo.

En la actualidad existen diferentes alternativas antimicrobianas, sin embargo, es casi imposible la eliminación de microorganismos endófitos sin causar un daño a la planta. Por lo cual es necesario la aplicación de antimicrobianos que controlen la proliferación de los microorganismos sobre el medio de cultivo del hospedero para evitar que se conviertan en contaminación. En el presente trabajo se estudiaron dos alternativas biotecnológicas que es el caso de los péptidos antimicrobianos (PAMs) y las nanopartículas de plata de síntesis verde.

Los PAMs son compuestos peptídicos de entre 10 y 60 aminoácidos producidos de manera innata como parte del sistema inmune de todos los organismos. Tienen alta capacidad de interacción con membranas por tener carga superficial positiva, lo que les da la capacidad de inhibir microorganismos por mecanismos como la formación de poros en membranas, mecanismo que dificulta el desarrollo de algún tipo de resistencia por parte del microorganismo.

Las nanopartículas (NP) son materiales que miden entre 1 y 100 nm, y poseen características físicas, comportamiento químico y actividad biológica diferente a materiales de mayor escala. Su síntesis puede ser por diferentes métodos que influirán directamente en sus características fisicoquímicas, como su tamaño, forma, composición elemental,

grado de dilución, aglomeración, y carga superficial. El método de síntesis verde es un método alternativo a la síntesis química, el cual minimiza los residuos tóxicos generados tras la reacción, y utiliza como agentes reductores y estabilizadores materia orgánica proveniente de vegetales, bacterias u hongos, es un método simple y económico donde se espera que las NP resultantes tengan mayor capacidad de interacción con los organismos debido a su recubrimiento orgánico. Las nanopartículas de plata (AgNP) tienen aplicaciones en diferentes áreas de la ciencia tales como: medicina, catalizadores, productos electrónicos, textiles, equipos analíticos, y agentes antimicrobianos. Además, es de gran interés el uso de AgNP en cultivos vegetales como estimuladoras del desarrollo vegetal ya sea para promover la brotación, la germinación y el enraizamiento, así como factor para alterar la expresión génica, actividad enzimática y actividad fisiológica. Las AgNP han sido también usadas en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, sin embargo, no es posible generalizar su efecto, pues su actividad y mecanismos de acción dependerá de las características específicas como estructura, tamaño, recubrimiento, carga y composición de las AgNP.

Debido a lo anterior, el efecto que tienen determinado tipo de AgNP sobre algunas especies vegetales podría no siempre ser benéfico, si no perjudicial o incluso tóxico, ya que la presencia de cantidades altas de plata desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno que oxidan e inactivan macro y micromoléculas del ciclo celular vegetal, desencadenando un estrés oxidativo en la planta. Durante este estado, una de las respuestas de la planta es la producción de metolglioxal (MG), que es altamente tóxico por su capacidad para degradar lípidos y proteínas de la membrana celular. Para medir el nivel de estrés que ejercen las AgNP en plantas, se utilizan métodos moleculares como el análisis de expresión de varios genes marcadores, entre estos están el sistema de las glioxalinas que están relacionados a la respuesta del estrés celular participando en la detoxificación del MG.

Las cactáceas son de gran importancia al funcionar como plantas modelo en la resistencia contra el estrés vegetal, sin embargo, su cultivo y propagación requiere largos periodos de tiempo. Entre estas esta *Mammillaria bombycina*, es una cactácea silvestre endémica los estados de Aguascalientes y Jalisco en México. Su principal interés hasta el momento ha sido como planta de ornato, sin embargo, en años recientes hemos realizado algunos estudios moleculares para tomarla como planta modelo. Por otro lado, *Hylocereus*

undatus es una cactácea cultivada principalmente en Centro América e Israel y se encarga de producir el fruto pitahaya o “fruta dragón”, que es comercializado en diversos países como fruta comestible y alimento funcional por su alto valor nutricional, capacidad antioxidante y antiproliferativa. Hasta la fecha no se ha encontrado algún reporte sobre el potencial que tienen las AgNP en el cultivo de estas cactáceas.

En el presente trabajo se realizaron estudios sobre la actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos GSUNION y GSLINK provenientes de glioxalasa de sorgo (*Sorghum bicolor*) y de las nanopartículas de plata de síntesis verde a partir de acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*) (*BvAgNP*). También se analizó el efecto de las *BvAgNP* sobre *M. bombycina* y *H. undatus in vitro*, reportándose los cambios encontrados en su microbiota asociada, los efectos en el crecimiento y desarrollo, y los cambios en la expresión de genes glioxalasa. Adicionalmente se trabajó en el aislamiento de tres microorganismos endófitos de *M. bombycina in vitro*, los cuales se identificaron molecularmente por secuenciación de la región ITS y 16s, como *Spicciomyces bomby*, *Mycobacterium bomby* y *Methylobacterium bomby*. Además, se realizaron pruebas de inhibición con *BvAgNP* contra los tres microorganismos identificados.

1. ANTECEDENTES.

1.1 Relaciones entre microorganismos y tejidos vegetales.

La relación entre las plantas y los microorganismos es fundamental, se sabe que absolutamente todas las especies vegetales mantienen algún tipo de relación con una comunidad diversa de microorganismos, los cuales se van asociando y formando un microbioma vegetal (Abdelfattah *et al.*, 2021). Estos microorganismos pueden ser bacterias, hongos, algas o arqueas, los cuales pueden ser endófitos, esto es, microorganismos que se alojan en el interior de los tejidos vegetales y que establecen interacciones biológicas con el hospedero en diferentes estados fisiológicos de la planta como la temperatura, el pH, los nutrientes o la disponibilidad hídrica. Algunos de los géneros comúnmente encontrados como endófitos son *Enterobacter* sp., *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta* sp., *Cladosporium* sp., etc. (Nair & Padmavathy, 2014; Cheng *et al.*, 2019; Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2021).

Diferentes microorganismos pueden asociarse a cualquier órgano de una planta, tallos, raíces, flores, frutos, incluso las semillas, dependiendo de la especie vegetal, el suelo, el medio ambiente y el manejo humano. En el caso de las semillas, incluso pueden existir diferentes especies de microorganismos asociados en cada tejido de esta, ya sea la cubierta de la semilla, el embrión, el endospermo o el perispermo, pudiéndose dividir estos microorganismos en transitorios, que se encuentran en las semillas pero pueden o no transmitirse a la plántula en desarrollo, y los persistentes o transmitidos, que son aquellos que se encuentran en la semilla y si se transmiten a la plántula en desarrollo (Abdelfattah *et al.*, 2021).

La asociación de las plantas con hongos y bacterias endófitas se ha dado desde hace más de 400 millones de años (Abdelfattah *et al.*, 2021). La relación entre el fitohospedero y los endófitos es muy compleja y puede convertirlos en mutualistas, patógenos latentes, comensales, residentes temporales o saprófitos latentes (Cheng *et al.*, 2019; Rodríguez-Mendoza *et al.* 2021). Según Stevens en 1960, la interacción planta-patógeno puede describirse con el llamado “triángulo de la enfermedad” donde se establece que para que un microorganismo produzca enfermedad en una planta, esta debe ser genéticamente susceptible, el patógeno debe ser genéticamente virulento y las condiciones ambientales deben ser propicias para manifestar ambas condiciones anteriores.

1.1.1 Relaciones entre bacterias y tejidos vegetales.

Las bacterias son microorganismos procariontes pertenecientes al Dominio Bacteria, su reproducción es asexual por bipartición y su crecimiento depende de factores como temperatura, humedad, pH y nutrientes disponibles (Navarrete Maya *et al.*, 2014). Las bacterias se encuentran en todos los nichos del ambiente, incluido el suelo y especialmente la rizosfera, donde los microorganismos benéficos y patógenos influyen directamente sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Dentro de esa rizosfera pueden darse relaciones simbióticas mutualistas donde la planta exuda nutrientes orgánicos para los microorganismos y estos a su vez pueden ayudar al crecimiento y metabolismo radical, controlar las propiedades físicas y químicas del suelo y regular la contaminación. Así muchas bacterias mantienen relaciones benéficas para las plantas, como el caso de las rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal con mecanismos como la fijación de nitrógeno (Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010).

Sin embargo, también existen bacterias fitopatógenas. Actualmente se conocen más de 1600 especies bacterianas, de las cuales aproximadamente solo 100 causan alguna enfermedad en plantas, siendo en su mayoría saprófitas facultativas y extracelulares, que invaden el apoplasto o los vasos. Las bacterias fitopatógenas son bacilares a excepción del género *Streptomyces* que son filamentosas, además todas son aerobias y solo algunas anaerobias facultativas. Las enfermedades producidas por bacterias en plantas producen síntomas como marchitez, manchas en distintos órganos, pudrición, entre otros. Existen bacterias fitopatógenas Gram – como las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Ralstonia*, *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Erwinia* y *Pantoea*, y bacterias Gram + como las pertenecientes a los géneros *Curtobacterium* y *Clavibacter* (Navarrete Maya *et al.*, 2014).

1.1.2 Relaciones entre hongos y tejidos vegetales.

Los hongos al igual que las bacterias, producen comúnmente enfermedades en otros organismos, existen más de 8000 especies de hongos que producen enfermedades en plantas. Se dice que todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas, pudiendo ser hongos biotróficos: parásito que se nutren a expensas de las células vivas del hospedante; hemibiotróficos: aquellos que mantienen viva la célula las primeras etapas para después matarla, y necrotrofos: aquellos que invaden un tejido y se alimentan de tejido muerto.

Una planta y un hongo pueden interactuar de diferentes maneras. El primer tipo de relación que puede presentarse es el parasitismo, donde un organismo parásito vive sobre o dentro de otro llamado huésped y obtiene alimento de él. En este caso existen los parásitos obligados (biótrofos, que crecen y se reproducen solo de huéspedes vivos) y los no obligados (viven en huéspedes vivos, muertos). Otro tipo de relación es de patogenicidad, donde el paracito interfiere con una o más de las funciones esenciales de la planta. La relación de simbiosis, donde ambos miembros se benefician de la asociación. El saprofitismo se presenta cuando el hongo crece en sustrato no vivo o dentro de una planta viva, aquí puede haber saprófitos facultativos, los cuales la mayor parte del tiempo viven como parásitos, pero pueden también crecer en materia muerta. Y finalmente, existen parásitos facultativos, los cuales permanecen como necrótrofos o saprófitos, pero también pueden parasitar plantas vivas.

Las cactáceas se ven comúnmente atacadas por enfermedades producidas por hongos, como el caso de la podredumbre del cuello del tallo ocasionada por *Phytophthora*, la pudrición interna ocasionada por hongos como *Phoma* spp., *Monosporium*, *Sporotrichum* y otros, y muchas veces esta pudrición es mortal para la cactácea. Otras enfermedades son la fusariosis que es un daño en raíz y parte baja del tallo ocasionada por *Fusarium oxysporum*. En *Mammillaria* y en *Echinocereus* se ha visto una enfermedad conocida como roya, la cual produce ampollas y póstumias en los tallos con desprendimiento de espinas, esta enfermedad es ocasionada por el hongo *Uromyces* sp. En cactáceas injertadas se ha tenido problemas de contaminación por *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris cactivora*, *Phytophthora* spp. y *Collectotrichum* spp. (Cho et al., 2016)

1.1.3 Contaminación en cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

El tipo de contaminación presente en un cultivo *in vitro* depende y es indicativa del punto del proceso de cultivo o establecimiento de este en el que se contaminó. En ocasiones la contaminación de los cultivos proviene del proceso de manipulación durante el cultivo, sin embargo, también puede provenir directamente de las semillas durante el establecimiento *in vitro*, esto debido a que en estos órganos también es posible la asociación microbiana y un proceso de desinfección superficial de la semilla podría no eliminar todos los microorganismos asociados, dejando un pequeño número de ellos o incluso una alta diversidad de hongos, bacterias y/o arqueas (Abdelfattah et al., 2021). Los cultivos de tejidos vegetales tienen el riesgo de contener contaminación latente, y es muy

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

difícil poder identificarla, lo que los hace poco confiables en ese sentido, ya que si se llegara a cambiar alguna condición ambiental, como pH, temperatura, características del medio, o incluso cuando se quisiera pasar la planta a suelo, la contaminación podría manifestarse y proliferar rápidamente, lo que traería un gran riesgo en el desarrollo de la planta, pudiendo causarle deficiencias de crecimiento, síntomas de enfermedad o incluso la muerte (Leifert & Waites, 1994).

Es muy común que la contaminación por bacterias en cultivos vegetales *in vitro* permanezca latente por largos periodos de tiempo, ya que las condiciones podrían ser poco adecuadas para su desarrollo. Sin embargo, cuando existen hongos filamentosos y/o levaduras en los cultivos *in vitro*, estos tienden a manifestarse rápidamente, ya que, por lo general, los medios de cultivo utilizados contienen todos los nutrientes necesarios para su desarrollo. De esta forma, los microorganismos endófitos pueden desarrollarse y convertirse en patógenos para la planta (Leifert & Cassells, 2001).

Los medios de cultivo utilizados para plantas *in vitro*, comúnmente carecen de factores de crecimiento o vitaminas necesarias para el desarrollo de bacterias, además del pH poco acidificado, por lo que este tipo de contaminación depende estrechamente del material vegetal que si contiene dichos nutrientes y le permite prevalecer, sin embargo, la planta misma durante su desarrollo puede liberar exudados o metabolitos secundarios que pueden alterar las características del medio o funcionar como antibacterianos (Leifert *et al.*, 1994). Otro aspecto para tomar en cuenta es que los cultivos de tejidos vegetales normalmente tienen regímenes de temperatura de incubación más bajos que las temperaturas de crecimiento óptimo bacteriano, por lo que un cambio en la temperatura de incubación podría ocasionar que un contaminante latente se tornase fitopatógeno. En el caso de los hongos, las temperaturas de incubación de tejidos vegetales son apropiadas también para ellos, por lo que es más fácil que una contaminación fúngica latente se manifieste.

Las relaciones entre plantas y bacterias u hongos endófitos, puede traer algunos beneficios al hospedero como estimular su crecimiento, ayudar en la fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas, ataque a fitopatógenos, producción de sideróforos, disminuir el estrés abiótico y biótico (inmunidad contra herbívoros y patógenos). En el caso de las cactáceas, que son especies que crecen en condiciones adversas, se ha visto que tienen la capacidad de formar un holobionte con su microbiota endófito, lo que influye en muchos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

casos a aumentar su capacidad para soportar sequía, alta salinidad, escasas de nutrientes, alto contenido de metales pesados, etc. (Leifert & Waites, 1994; Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2021).

En una relación simbiótica, tanto el hospedero como el endófito producen metabolitos secundarios tóxicos, los cuales deben estar en equilibrio para que la relación se mantenga. Sin embargo, bajo ciertas condiciones ambientales adversas o durante la senescencia de la planta, este equilibrio puede romperse y el endófito convertirse en patógeno y enfermar a la planta. Es por eso, que en ocasiones se utilizan los términos “endófitos temporales” o “patógenos latentes” a algunos hongos endófitos que infectan a las plantas sin que éstas manifiesten síntomas durante un tiempo (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2021).

Eliminar los contaminantes latentes de un cultivo es muy difícil, se ha reportado que incluso compuestos antibacterianos y antifúngicos de amplio espectro no logran eliminar todos los microorganismos indeseados, además los tratamientos suelen ser tan agresivos que la planta puede verse afectada en su desarrollo y/o enraizamiento (Leifert *et al.*, 1994). Es por esto, que, en muchas ocasiones, suelen usarse tratamientos bacteriostáticos o fungistáticos, sin embargo, muchas veces al eliminarse dicho agente, el contaminante vuelve a aparecer.

Para el cultivo de tejidos vegetales, es un gran problema la detección de contaminantes bacterianos y fúngicos, y sobre todo su eliminación. Ya que estos contaminantes pueden ser endófitos y estar latentes por mucho tiempo hasta expresarse, además muchos de los antimicrobianos solo inhiben a los contaminantes y no los eliminan (Leifert & Cassells, 2001).

Uno de los métodos moleculares para la identificación de contaminantes, es mediante el método bioinformático de secuenciación por regiones conservadas como ITS para hongos y diferentes regiones ribosomales para bacterias. Es posible aplicar este método para la identificación de microorganismos fitopatógenos en cultivos *in vitro* (Zarrin *et al.*, 2016).

1.2 Péptidos antimicrobianos.

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son oligopéptidos con longitud de entre 10 a 60 aminoácidos y de entre 2 a 9 KDa, obtenidos naturalmente de la degradación hidrolítica de

proteínas predecesoras más grandes, incluida una secuencia señal. En la mayoría de los PAMs su estructura es α helicoidal de naturaleza catiónica y anfipática o hidrofóbica (Shabir *et al.*, 2018; Chaudhary *et al.*, 2024). Tienen alta capacidad de interacción con membranas bacterianas que tienen carga negativa, provocando daño y por lo tanto muerte celular de una alta cantidad de microorganismos como bacterias, hongos y parásitos eucariotas (Quezada-Rivera *et al.*, 2022). Los PAMs son sintetizados de manera innata por todos los seres vivos como parte de su sistema de defensa contra una amplia gama de patógenos, por lo que son conocidos como péptidos de defensa del huésped (Shabir *et al.*, 2018). Los PAMs, a diferencia de otros antibióticos convencionales, tienen la capacidad de inhibir microorganismos por mecanismos como la formación de poros en membranas, dificultando el desarrollo de algún tipo de resistencia por parte del microorganismo (Quezada-Rivera *et al.*, 2022). Sin embargo, existen muchas dificultades para determinar las características responsables del modo de acción particular de un PAM, y los mecanismos propuestos no son totalmente conocidos, por lo que el diseño de mecanismos y el conocimiento real de la actividad se realiza principalmente de forma experimental (Pirtskhalava *et al.*, 2021).

1.2.1 Clasificación de los PAMs.

Existen diferentes sistemas de clasificación de los PAMs debido a su gran diversidad. Por lo tanto, pueden clasificarse según:

- a) Maquinaria biosintética productora: Existen aquellos codificados por genes y aquellos sintetizados por sistemas enzimáticos múltiples.
- b) Fuente de producción: Los PAMs pueden ser provenientes de mamíferos, plantas, anfibios, insectos o microorganismos.
- c) Actividad inhibitoria: Los PAMs pueden poseer actividad antiviral, antibacteriana, antifúngica y/o antiparasitaria.
- d) Estructura tridimensional: Según su estructura se dividen en 4 familias; α hélice (Estructuras helicoidales: cecropinas, melitina, dermaseptina), β (estructuras β plegadas: defensinas, droscomicina, protegrina), $\alpha\beta$ (estructuras helicoidales o β plegadas) y no $\alpha\beta$ (no contiene estructuras helicoidales ni β plegadas) (Shabir *et al.*, 2018).
- e) Objetivos moleculares: Se dividen en dos familias; los dirigidos a la superficie celular como membranas, pared celular, o lípidos, carbohidratos, proteínas y receptores

extracelulares. Y aquellos dirigidos a componentes intracelulares (Quezada-Rivera *et al.*, 2022).

1.2.2 Mecanismos de acción de los PAMs.

El mecanismo de acción está relacionado a su estructura, aquellos PAMs con estructura β plegada podrán formar conjuntos supramoleculares y podrán penetrar las membranas microbianas creando poros en ellas, lo que permitirá su interacción con objetivos intracelulares como promotores, motivos de unión a ARNm, regiones reguladoras de enzimas, y dominios de plegamiento proteico, inhibiendo y finalmente matando a la célula microbiana (Chaudhary *et al.*, 2024).

Se conocen dos tipos de mecanismos de acción antimicrobiana de los PAMs. El principal mecanismo se deriva de su capacidad de interacción con membranas o paredes celulares, gracias a que la mayoría de los PAMs poseen cargas netas positivas y un alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos mientras que las membranas bacterianas poseen cargas negativas. Sin embargo, existen diferencias de composición entre membranas bacterianas, por lo cual la interacción entre éstas y los PAMs puede ser específica. Por otro lado, están aquellos mecanismos que no van dirigidos a membranas celulares, en los cuales, los PAMs entran al citoplasma celular por penetración directa o endocitosis y una vez ahí podrán atacar diferentes componentes celulares (Quezada-Rivera *et al.*, 2022) o funciones celulares, por ejemplo, la biosíntesis de la pared celular, la división celular, y procesos citoplasmáticos como la síntesis macromolecular y las proteínas de choque térmico (Chaudhary *et al.*, 2024).

PAMs dirigidos a membrana celular. Se describen con los siguientes modelos:

- a) Modelo de alfombra (Han *et al.*, 2017). Los PAMs se unen por su extremo hidrofóbico y de forma paralela a la membrana, recubriéndola. En una alta concentración de PAMs, puede ocurrir el rompimiento de la membrana y formación de micelas solubles.
- b) Modelo de poste por poro toroidal (Wimley, 2010). Los PAMs se incrustan verticalmente en la membrana celular para después doblarse y formar un túnel de 1 a 2 nm.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- c) Modelo de poste por duela de barril (Shabir *et al.*, 2018). Los PAMs se incrustan verticalmente y atraviesan la membrana celular en forma de multímeros que forman canales que permiten el flujo citoplasmático colapsando la membrana celular.

PAMs no dirigidos a membrana celular. Según su sitio de acción se dividen en:

- a) Inhibición de la biosíntesis de proteínas. Alteraciones en la transcripción, traducción y ensamblaje de péptidos funcionales.
- b) Inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos.
- c) Inhibición de la actividad de proteasas.
- d) Inhibición de la división celular. Interrupción de la replicación del ADN, ciclo celular o separación cromosómica.

1.2.3 PAMs derivados de plantas.

Las plantas producen PAMs como uno de sus sistemas químicos de defensa contra factores bióticos, su síntesis es de manera sistémica en casi cualquier órgano vegetal y cualquier etapa de su ciclo de vida, además una misma especie vegetal puede sintetizar una amplia variedad de péptidos. Los PAMs derivados de plantas se caracterizan por tener estructuras compactas resistentes a la degradación química y proteolítica gracias a contener múltiples enlaces disulfuro por ser ricos en cisteína (Cys). Estos PAMs se dividen en familias como las defensinas, tioninas, proteínas de transferencia de lípidos, ciclótidos, snakinas y tipo heveínas (Quezada-Rivera *et al.*, 2022).

1.2.4 Péptidos sintéticos a partir de glioxalasa de sorgo.

Muñoz-Carrillo (2022) diseñó dos péptidos sintéticos a partir de péptidos encontrados en proteínas putativas SbGLY I-III.1 (CLYGGRVVGWV), SbGLY II-II.1 (PCHTKGHISYYVT) y GLY DJ-I-C.1.2 (IRKFFGHGRAKAV) identificadas a partir del genoma de *Sorghum bicolor* y analizadas *in silico* mediante diversas herramientas obteniendo altas probabilidades de ser funcionales según sus propiedades fisicoquímicas y similitud con otros péptidos reportados. Así propuso el diseño de dos péptidos sintéticos: el primero llamado GSUNION, que es la unión de los tres péptidos seleccionados, y el segundo llamado GSLINK, conformado de los tres péptidos seleccionados separados entre sí por regiones ricas en glicina y serina [(GGGS)]₃ que funcionan como separadores para que cada uno de los péptidos se comporte de manera independiente favoreciendo su flexibilidad y plegamiento. La predicción de algunas de sus propiedades relacionadas a su

funcionalidad se reporta en la tabla 1. Además, Muñoz-Carrillo (2022) predijo *in silico* la estructura tridimensional de ambos péptidos, teniendo el GSLINK regiones α hélice (Figura 1) además, Muñoz-Carrillo (2022) predijo una mayor flexibilidad del péptido sintético GSLINK, lo cual podría facilitar su función e interacción individual con membranas bacterianas y por lo tanto una mayor actividad antimicrobiana.

Tabla 1. Secuencia y propiedades fisicoquímicas de los péptidos sintéticos GSUNION y GSLINK.

Péptido sintético GSUNION		
CLYGGRVVGGVVPCHTKGHISYYVTSIRKFFGHGRAKAV		
No. aa	39	
PM	4.22 KDa	
Carga neta	6.75	
pI	10.04	
GRAVY	0.156	Péptido hidrofílico, conformación globular.
% de hidrofobicidad	38%	Alta solubilidad en agua y poca toxicidad.
Índice de estabilidad	33.51	Proteína estable
Índice terapéutico	6.63	Relación toxicidad – eficiencia baja. Péptido no selectivo.
Tiempo estimado de vida	1.2 h (reticulocitos de mamíferos, <i>in vitro</i>) >20 h (levaduras, <i>in vivo</i>) > 10 h (<i>E. coli</i> , <i>in vivo</i>)	
Péptido sintético GSLINK		
CLYGGRVVGGVVGGGGSGGGGSGGGGSPCHTKGHISYYVTSGGGGSGGGGSGGGGSIRKFFGHGRAKAV		
No. aa	69	
PM	6.11 KDa	
Carga neta	6.75	
pI	10.04	
GRAVY	-0.120	Péptido hidrofílico, conformación globular.
% de hidrofobicidad	21%	Alta solubilidad en agua y poca toxicidad.
Índice de estabilidad	57.82	Proteína inestable
Índice terapéutico	80.74	Relación toxicidad – eficiencia alta. Péptido selectivo.
Tiempo estimado de vida	1.2 h (reticulocitos de mamíferos, <i>in vitro</i>) >20 h (levaduras, <i>in vivo</i>) > 10 h (<i>E. coli</i> , <i>in vivo</i>)	

Se muestran las secuencias de los péptidos sintéticos GSUNION y GSLINK donde los aminoácidos en color verde corresponden a SbGLY I-3.1, los de color amarillo corresponden a SbGLY 2–2.1, los de color azul corresponden a GLY DJ-I-C.1.2 y los de color rojo corresponden a las regiones espaciadoras [(GGGS)]³.

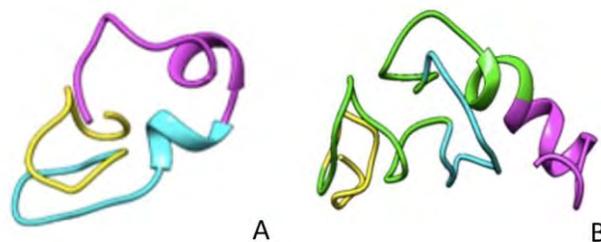


Figura 1. Predicción *in silico* de la estructura tridimensional de péptidos sintéticos. A) GSUNION B) GSLINK. Adaptado de tesis Doctoral (pag 72-73) por Muñoz-Carrillo, 2022, Universidad Autónoma de Aguascalientes.

1.3 Nanopartículas.

La nanotecnología se encarga del diseño y síntesis de materiales con escalas nanométricas, esto es, que miden entre 1-100 nm. Estos materiales son conocidos como nanomateriales y por lo general poseen propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las que poseen aquellos materiales de mayor dimensión (Islam *et al.*, 2021).

1.3.1 Definición de nanopartículas.

Las nanopartículas (NP) son nanomateriales que han adquirido gran interés actualmente, en especial las NP metálicas de plata (AgNP), a las que se les han encontrado aplicaciones médicas, antibacterianas, antifúngicas, antivirales y anticancerígenas, además en energías renovables, tratamiento del agua, sensores, electrónica e industria textil (Muñoz-Carrillo *et al.*, 2020; Lotfy *et al.*, 2021).

Una nanopartícula típica está compuesta de partículas primarias más pequeñas que tienen una relación de superficie-volumen muy alta. Las NP poseen cerca del 98, 40 y 10 % de sus átomos sobre la superficie o en los límites de grano si las partículas primarias que las componen son de orden 1, 5 y 20 nm respectivamente. Lo anterior da propiedades electrónicas, ópticas, eléctricas, magnéticas, químicas, biológicas y mecánicas, características a las NP y diferentes a las de otros materiales nanoestructurados (Islam *et al.*, 2021).

Existe una clasificación para las NP, la cual las divide entre NP naturales, NP incidentales, NP de ingeniería, NP amorfas, NP cristalinas, NP poliméricas, o NP de materiales compuestos. Además, según su composición química pueden ser no metálicas

(NP de carbono), metálicas (NP de oro Au y plata Ag), semiconductoras (NP de selenuro de cadmio CdSe) y combinadas (Hernández-Díaz, 2013).

1.3.2 Propiedades de las nanopartículas.

Las nanopartículas metálicas son de agregados aislados de átomos de metales, los cuales se encuentran rodeados por una cápsula protectora o estabilizadora la cual evita su aglomeración (Islam *et al.*, 2021).

1.3.3 Síntesis de nanopartículas.

Las NPs metálicas pueden ser sintetizadas a través de diferentes métodos, y según sea el método de síntesis empleado, se obtendrán características fisicoquímicas particulares, como tamaño, carga superficial, aglomeración, grado de dilución y composición elemental. Algunos de los métodos de síntesis empleados son la síntesis química mediante microemulsión, reducción química, irradiación ultrasónica, síntesis electroquímica y más recientemente la aplicación de métodos biológicos que hacen uso de microorganismos, plantas y sus extractos. Estos métodos biológicos se han ido estudiando con mayor interés debido a la gran preocupación que produce la contaminación al medio ambiente, buscando así metodologías limpias que eviten problemas de contaminación ambiental (Hernández-Díaz, 2013).

1.3.3.1 Síntesis por reducción química.

La síntesis por reducción química es el método más comúnmente utilizado por su simplicidad y alto rendimiento. Se basa en que un precursor metálico, en forma de sal metálica, se hace reaccionar con un agente reductor como el citrato de sodio, el ácido ascórbico, alcohol o borohidruro. Sin embargo, se sabe que estos agentes reductores son tóxicos para el medio ambiente, por lo que su utilización podría provocar graves problemas de contaminación y las NP sintetizadas a partir de este método también podrían adquirir alta toxicidad debido a que poseen la capacidad de absorber sustancias (Muñoz-Carrillo *et al.*, 2020; Bruna *et al.*, 2021).

1.3.3.2 Síntesis verde.

También conocida como síntesis biológica, es un método alternativo de síntesis de NP el cual no utiliza reductores ni estabilizadores químicos, si no que los sustituye por vitaminas, alcaloides, carbohidratos, antioxidantes, fenoles, proteínas y enzimas obtenidos

de organismos vivos como bacterias, algas, hongos, levaduras y plantas. Este método ofrece muchas ventajas, como la reducción de costos de síntesis, los procesos son más sencillos y las NPs obtenidas son muchas veces de mejor calidad que las obtenidas por otros métodos, y además son compatibles para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas (Islam *et al.*, 2021).

Para el caso de síntesis verde de NP a partir de plantas como agente reductor y estabilizante, se han reportado metodologías que utilizan especies como *Medicago sativa*, *Cinnamomum camphora*, *Azadirachta indica*, *Boerhaavia diffusa*, *Malva parviflora*, *Olea chrysophylla*, *Lavandula dentata*, *Pelargonium beides*, *Opuntia ficus-indica*, etc. (Muñoz-Carrillo *et al.*, 2020). Se cree que este tipo de síntesis prolonga la vida útil de las NP metálicas, evita efectos poco deseables como la agregación en soluciones acuosas y solventes orgánicos, permite la reutilización y reciclaje de las NP, son fáciles de implementar y son amigables con el medio ambiente (Hernández-Díaz, 2013).

1.3.4 Formas de las nanopartículas.

La forma de las NPs es otro aspecto de gran importancia, pues con ello se puede saber la aplicación en la nanotecnología que podrán tener. Las formas posibles de una NP son esféricas, cilíndricas, en barras y plaquetas. Se sabe que las propiedades físicas están relacionadas al tamaño y composición química, mientras que las propiedades químicas de la superficie, incluso los defectos e impurezas, contribuyen a la reactividad.

1.3.5 Caracterización de las nanopartículas.

Para poder caracterizar una NP en particular, se tienen que llevar a cabo metodologías que permitan revelar su presencia por resonancia del plasmón superficial, el tamaño promedio de partícula por difracción de rayos X, la forma de la nanopartícula por microscopía electrónica de barrido (MEB), su composición elemental por microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de electrones y espectroscopía de rayos X de energía dispersa (EDS). Además, debe describirse la funcionalización de la nanopartícula calculando su radio hidrodinámico y potencial Z.

Las AgNP tienden a aglomerarse reduciendo su relación superficie-volumen y por lo tanto su efecto catalítico, es por esto que es necesario utilizar agentes estabilizadores, los cuales se absorben en la superficie de las AgNP protegiéndolas de oxidantes y reductores que podrían generar su catálisis (Islam *et al.*, 2021).

1.3.6 Aplicaciones de las nanopartículas de plata.

Las NP de plata (AgNP) tienen gran variedad de aplicaciones que se han ido estudiando durante los últimos años. La razón por la cual las AgNP tienen tanta aplicación es porque a escalas nanométricas, la plata adquiere propiedades físicas, químicas y biológicas muy peculiares, además de actividad antimicrobiana. Es por esto que actualmente las AgNP son utilizadas como agentes bactericidas o fungicidas en áreas como la biotecnología, bioingeniería, ingeniería textil, tratamiento del agua y en medicina para el control de infecciones, tratamiento de heridas y quemaduras y en recubrimientos de implantes (Bruna *et al.*, 2021).

Es bien conocido que las AgNP tienen efecto antimicrobiano contra bacterias como *Escherichia coli* (Hernández-Díaz, 2013), contra levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y contra hongos como *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp. (Garcidueñas-Piña 2016).

1.3.7 Efecto de nanopartículas de plata en el crecimiento y desarrollo de plantas.

Las AgNP tienen gran variedad de aplicaciones entre las cuales se encuentra el uso en cultivos vegetales como promotores de brotación, elongación de raíz, incremento de germinación, actividad fisiológica, cambios en la expresión génica y actividad enzimática, y en general, estimulación del desarrollo. Es por eso que autores como Chávez-García *et al.*, 2020, las consideran como una “tecnología potencial para reactivar la agricultura, industria alimentaria, mejora de cultivos y protección de las plantas”.

Está comprobado que la aplicación de AgNP mejora la germinación de semillas y crecimiento de plántulas en muchas especies, y en algunas otras también promueven la elongación de raíz y producción de tejido, estos efectos beneficiosos podrían atribuirse a un aumento en la producción de enzimas responsables de las reacciones metabólicas (Ruiz Torres *et al.*, 2016).

El estudio de las AgNP es muy amplio, ya que son materiales muy variados cuyos efectos dependen de su estructura, tamaño, recubrimiento, carga, composición, etc. Por lo que no se puede generalizar el efecto que tendrá una AgNP, ya que todas sus características dependerán de su tipo de síntesis, y seguir mecanismos de acción sobre otros organismos y biomoléculas característicos, en este sentido, entre más pequeña sea

la AgNP más tóxica será, al aumentar su área de contacto, así que se deberán usar menores concentraciones para logra un efecto benéfico (Esquivel-Figuero & Mas-Diego).

A pesar de que autores como Anwar *et al.* (2021), han aportado muchos efectos positivos en la biotecnología vegetal como lo son la desinfección de plantas, diferenciación de callos, transformación genética, producción de biomasa y procesamiento de metabolitos secundarios, etc., es importante tener presente que no todos los resultados son prometedores. Es un hecho de que las AgNP ejercen un efecto en plantas, sin embargo, este efecto podría no siempre ser benéfico, en especial cuando se trata con altas concentraciones de nanopartículas, convirtiéndose en un tóxico no solo para los microorganismos fitopatógenos sino también para el organismo vegetal (Spinoso, 2016).

1.3.8 Efecto de las nanopartículas de plata en el crecimiento y desarrollo de plantas *in vitro*.

Analizando las AgNP como estimuladores del crecimiento vegetal en cultivos *in vitro*, está claro que existen otras alternativas en el cultivo *in vitro* que pueden incluso dar mejores resultados, como el uso de auxinas, citocininas o carbón activado. Sin embargo, las AgNP aportan una ventaja sobre otros reguladores de crecimiento, que es funcionar también como desinfectante contra bacterias y algunos hongos (Chávez-García *et al.*, 2020). En este aspecto, se ha comprobado que las AgNP “tienen efecto bactericida, bacteriostático y fungicida, demostrado contra patógenos como *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Shigella*” (Esquivel-Figuero & Mas-Diego, 2021). Por todo lo anterior se consideran una muy interesante alternativa para mejorar los cultivos *in vitro*.

Las AgNP han sido probadas en cultivos *in vitro* con interesantes resultados, Esquivel-Figuero y Mas-Diego (2021) mencionan que en un estudio con frijol, las nanopartículas a concentraciones de 450 – 722 mg/L aumentaron la germinación y crecimiento de las plantas y se utilizó agar para evitar la precipitación de las nanopartículas. Si bien este estudio comprueba algunos de los beneficios del uso de las AgNP, otros investigadores complementan sus resultados tomando en cuenta las concentración de AgNP que producen un efecto beneficio en el crecimiento y desarrollo de la planta y que además mantiene condiciones axénicas en el cultivo, tal es el caso de Spinoso (2016), quien trabajó en la regeneración *in vitro* de vainilla con aplicación de AgNP por inmersión temporal a concentraciones de 0, 25, 50, 100 y 200 mg/L, y observó que la contaminación bacteriana se eliminó a partir de los 50 mg/L, mientras que a los 25 y 50 mg/L aumentó

significativamente el crecimiento a las plántulas, crecimiento que era inhibido al aumentar la concentración de AgNP a 100 mg/L, por lo tanto se consideró los 50 mg/L de AgNP como concentración óptima para el cultivo de vainilla *in vitro*.

Otra referencia que se tiene es lo reportado por Chávez-García *et al.* (2020), quienes comprobaron que las AgNP a una concentración óptima de 50 mg/L producen aumento del 35.5% en la longitud de brotes en plántulas de gladiolo *in vitro* respecto a un control sin AgNP, pero además comprobaron que a esa misma concentración se lograba un efecto desinfectante al 91.67% en ápices de gladiolo *in vitro* y su medio de cultivo.

1.3.9 Nanopartículas de plata sintetizadas a partir de acelga.

Garcidueñas-Piña *et al.* (2023) reportaron la síntesis de 3 diferentes AgNP por métodos de síntesis verde a partir de acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*), rábano (*Raphanus sativus*) y albahaca (*Ocimum basilicum*). En el caso de las sintetizadas a partir de acelga fueron denominadas como: BvAgNP.

En su caracterización se reportaron datos como un máximo de absorción a 420 nm en el espectro UV-Visible, y una absorbancia de 0.122. Las BvAgNP son esferas de 78 nm de diámetro con 39.76 % plata, un diámetro hidrodinámico de 158.7 nm y un potencial Z de -24 por lo que son estables en tampón fosfato. Su función biológica fue evaluada en la desinfección de semillas de *Arabidopsis thaliana* y *Psidium guajava* (guayaba), su actividad antimicrobiana contra varias bacterias como *E. coli* (Garcidueñas-Piña *et al.*, 2023).

1.4 Cactáceas y su desarrollo *in vitro*.

La familia de las cactáceas incluye una gran variedad de especies. Pertenecen al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Caryophyllales y familia Cactaceae. Se dividen además en cuatro subfamilias: son Cactoideae (con aproximadamente 1500 a 1800 especies), Opuntioideae, Maihuenioideae y Pereskioideae. Una de las principales características de las cactáceas es su gran especialización y adaptación para habitar en zonas áridas y semiáridas y bajo condiciones extremas, lo que las hace de gran interés para estudios anatómicos y ecológicos (Shishkova *et al.*, 2013).

Sin embargo, una gran cantidad de especies de cactáceas se encuentran amenazadas y en peligro de extinción, debido a sus largos ciclos de vida, lento crecimiento, bajas tasas de reproducción, distribución geográfica restringida, susceptibilidad a pudrición

por hongos, etc., además del saqueo ilegal para su comercialización, destrucción de su hábitat y consumo por animales depredadores. Es por esto que la biotecnología ha desarrollado métodos como la propagación *in vitro* para producir gran cantidad de ejemplares vegetales rápidamente, ya que según los estudios, la naturaleza de la técnica de propagación acelera considerablemente el crecimiento de las plantas cultivadas, aunque también se ha observado que cada especie responde de manera diferente a las condiciones de cultivo y a los reguladores utilizados, por lo cual es necesario hacer estudios individuales para encontrar las condiciones óptimas para cada una (Retes-Pruneda *et al.*, 2007).

1.4.1 *Mammillaria bombycina*.

Mammillaria bombycina es una cactácea silvestre mexicana. Se caracteriza por ser endémica de Jalisco y Aguascalientes, principalmente encontrada en la parte suroeste de los municipios de Calvillo y Jesús María del estado de Aguascalientes. Crece en paredes de cañadas a 1847 y 2417 metros de altitud, o cerca de las cañadas a ras del suelo. Tiene como característica crecer a manera de colonias, en zonas con suelos húmedos, en asociación con musgos y encino (*Quercus rugosa*), o en zonas más secas asociada a gramíneas y otras cactáceas (Meza-Rangel *et al.*, 2014).

Esta cactácea fue descrita por primera vez por Quehl en 1910. Su morfología es de tallos verdes de forma globosa con ápices sutilmente hundidos y cubiertos con lana blanca la cual cubre todo el tubérculo, además tiene axilas con lana blanca abundante y cerdas. Sus areolas, primero son redondeadas con algo de lana blanca y posteriormente son alargadas y desnudas. Posee entre 30 a 40 espinas radiales generalmente con punta rojiza, delgadas y rígidas, dispuestas en horizontal en forma de peine. Mide aproximadamente 20 centímetros de altura con 6 centímetros de diámetro (Figura 2) (Manzo-Rodríguez, 2010; Hernández-Camacho, 2016).

M. bombycina es considerada una especie de alto valor para México, sin embargo, se encuentra en peligro de extinción por su escasa población y limitada distribución. Manzo-Rodríguez (2010) mencionan que a cualquier alteración a su hábitat podría desaparecer, y la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) la consideró una especie de protección especial en su norma NOM-059-SEMARNAT-2010 (Meza-Rangel *et al.*, 2014). Debido a lo anterior, su protección es indispensable para evitar la pérdida de la biodiversidad mexicana.

Sin embargo, un aspecto importante de esta especie es que posee alta belleza estética por su crecimiento en forma de racimo y la característica de su lana y espinas, características que promueven su comercialización como planta de ornato (Graham, 2014). En México, ésta y otras muchas especies de cactáceas son comercializadas indiscriminadamente para su utilización en la elaboración de jugos concentrados, postres, jarabes, mermeladas y deshidratados, pero los especímenes recolectados para estos fines son comúnmente tomados directamente de su hábitat natural y rara vez son reemplazados o cultivados, empobreciendo grandemente la población de la especie.

Actualmente es muy difícil encontrar ejemplares de *M. bombycina* en zonas naturales, pues solo los que crecen en condiciones menos visibles logran sobrevivir al saqueo. Además, la zona de distribución de esta cactácea es pequeña, su tasa de crecimiento es baja y sus ciclos de vida son largos. Aún más, algunas actividades humanas como la destrucción del hábitat por asentamientos humanos, el saqueo ilegal o la introducción de animales en la zona que devoran individuos jóvenes o semillas de la cactácea, etc. afectan fuertemente a la población de *M. bombycina*, pues la planta al ser dañada o extraída de su hábitat no puede mantener su ciclo reproductivo o incluso muere, dejando de lado la posibilidad de desarrollar mecanismos adaptativos de defensa (Meza-Rangel *et al.*, 2014).

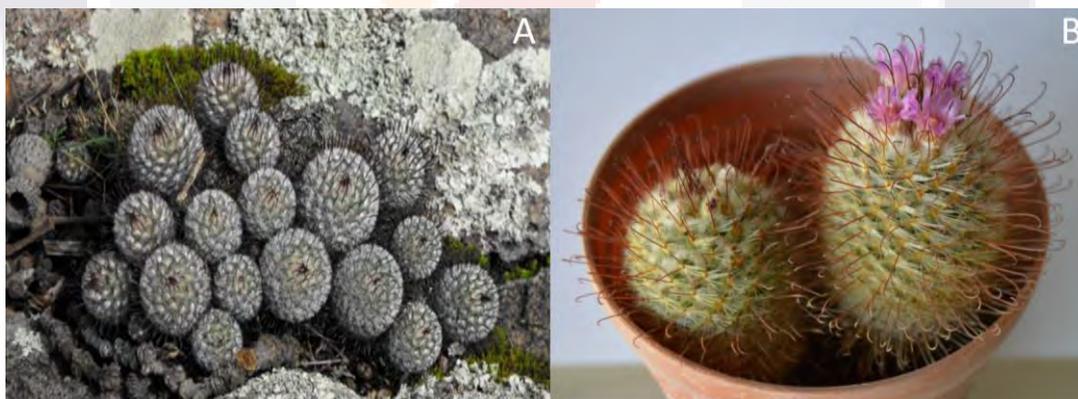


Figura 2. Morfología de *M. bombycina*. A) en estado silvestre (Figura donada por el laboratorio de Cultivo de tejidos vegetales de la UAA, 2017) B) cultivada en tierra (Figura donada por el laboratorio de Biología molecular de plantas de la UAA, 2024).

1.4.2 *Hylocereus undatus*.

Hylocereus undatus, llamada en algunas regiones como “baya de espino”, es una de las 19 cactáceas pertenecientes al género *Hylocereus* que producen la fruta conocida como Pitahaya o “fruta del dragón”. Esta especie en particular es la más conocida comercialmente por su característica pulpa blanca. La pitahaya ha ido adquiriendo gran interés comercial en México por ser un cultivo rentable, que crece bajo condiciones de climas áridos y su fruta es bien aceptada comercialmente en mercados regionales, nacionales e internacionales como en Europa, Asia y América debido a sus características exóticas (García-Rubio *et al.*, 2015; Velázquez Jiménez, 2020).

Esta cactácea crece como epífita trepadora, sus tallos son trialados y un poco ondulados, presenta raíces aéreas y flores aromáticas (Figura 3). Su principal característica son sus frutos globosos cubiertos de escamas foliáceas y exocarpo de color magenta, con el endocarpo color blanco, el cual presenta numerosas y pequeñas semillas (García-Rubio *et al.*, 2015). Posee mecanismos que le brindan resistencia a la sequía, como el metabolismo tipo CAM, y aspectos morfológicos que retienen y evitan la pérdida de agua como sistemas radicales grandes, tallos de cutícula gruesa, bajo número de estomas en el tallo, y un parénquima acuífero que ayuda a la acumulación de agua (Montesinos-Cruz *et al.*, 2015).

La importancia *H. undatus* es principalmente que su fruto ha servido como fuente de alimento para los pobladores de las regiones donde crece naturalmente, regiones donde también adquirió un significado cultural, y cuyos pobladores además comenzaron a comercializarla como alimento, planta de ornato y en menor proporción para uso medicinal. Actualmente es un cultivo muy comercializado a nivel mundial, lo que ha impulsado la realización de diversos tipos de estudios, tales como caracterizaciones morfológicas, fitosanitarios, análisis genéticos de algunos individuos cultivados, estudio de su sistema reproductivo, fisiología, etc. (García-Rubio *et al.*, 2015)

Naturalmente, esta especie se ha encontrado en diversos países americanos como Colombia, Costa Rica, Guatemala, México, Nicaragua y Perú, sin embargo, con el aumento de su interés como frutal comerciable durante las últimas décadas, se ha establecido de manera más tecnificada en países como Estados Unidos de América, Israel, Malasia y Tailandia. Su distribución actual en México se encuentra en los estados de Campeche, Chiapas, Guanajuato, Hidalgo, Quintana Roo, Yucatán, Tabasco, Veracruz, Guerrero,

Querétaro, Estado de México, Puebla, Oaxaca, Michoacán, Jalisco, San Luis Potosí, Colima y Sinaloa (García-Rubio *et al.*, 2015).



Figura 3. Morfología de *H. undatus*. Clona cultivada en tierra de las plantas *in vitro* utilizadas en el presente trabajo. A) Parte aérea B) Flor (Figura donada por el laboratorio de Cultivo de tejidos vegetales de la UAA, 2024).

1.5 Sistema glioxalasa.

Las enzimas glioxalasa están relacionadas a la respuesta del estrés celular. Están presentes tanto en procariontes como eucariontes, y conforman un sistema de enzimas que participan en una vía ubicua relacionada a la homeostasis celular, ya que participan en la detoxificación del metilglioxal (MG), el cual es un subproducto del metabolismo celular producido en mayor concentración ante el estrés celular, en el caso de las plantas puede ser debido a factores tanto bióticos como abióticos (Zucchetti, 2018). El MG es altamente tóxico para la célula, por lo cual es indispensable su regulación (Kaya *et al.*, 2020).

El sistema glioxalasa está conformado por la glioxalasa I (GLY I) (lactoilglutación liasa), la glioxalasa II (GLY II) (hidroxiacilglutación hidrolasa) y la glioxalasa III (GLY III) (D-lactato deshidrasa). En general las glioxalosas convierten α -cetoaldehidos en D-hidroxiácidos. Las GLY I y GLY II son metaloenzimas, que en conjunto catalizan la isomeración del α -cetoaldehido metilglioxal (MG) a D-lactato, con glutatión reducido (GSH) como cofactor. Mientras que la GLY III convierte irreversiblemente el MG en D-lactato en un solo paso sin el uso del cofactor GSH, ni iones metálicos (Figura 4) (Misra *et al.*, 1995; Subedi *et al.*, 2011).

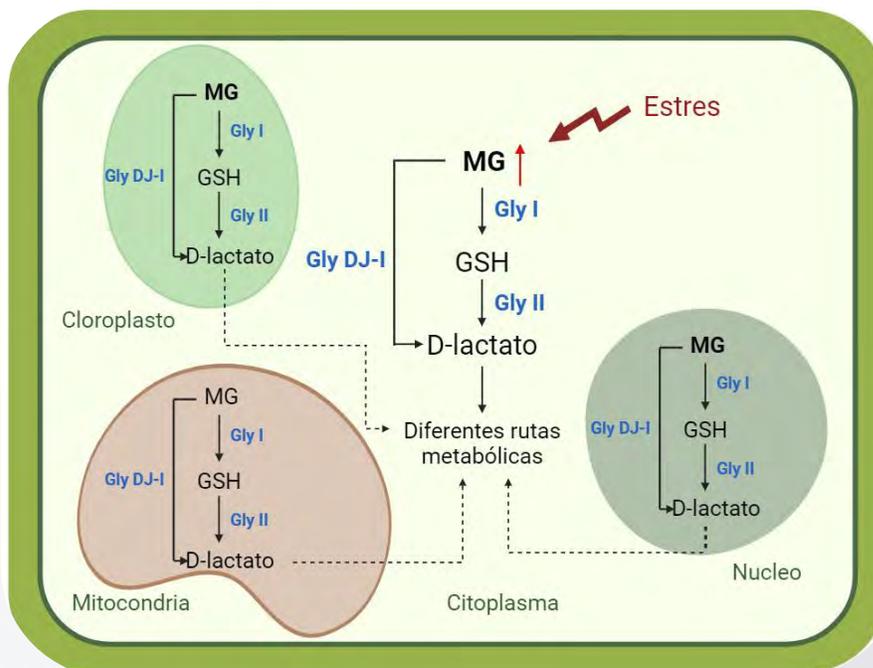


Figura 4. Detoxificación de MG en plantas por vía glioalasa. Adaptado de “De Novo Transcriptome of *Mammillaria bombycina* (Cactaceae) under *In Vitro* Conditions and Identification of Glyoxalase Genes” (p. 17), Enríquez-González *et al.*, 2022, *Plants*, 11(3):399. (Creado en BioRender).

1.5.1 Metilglioxal.

El MG se sintetiza principalmente a partir de la reacción no enzimática de dos triosas fosfato, la dihidroxi acetona fosfato (DHAP) y la gliceraldehido 3 fosfato (G3P), los cuales son compuestos intermediarios de la glicólisis y son altamente reactivos e inestables, por lo que a pH fisiológico suelen donar su protón α -carbonilo y generar un enediolato fosfato que a su vez pierde fácilmente su grupo fosfato generando MG (Zucchetti, 2018).

Existen otras rutas de síntesis para MG, como el metabolismo de aminoácidos, oxidación de la aminoacetona en el catabolismo de la L-treonina, la oxidación de cuerpos cetónicos y acetonas, además de rutas no enzimáticas como la reacción de Maillard y la lipoperoxidación (Zucchetti, 2018).

La concentración a la cual se encuentra el MG depende de la especie y el tejido que se trate. Su toxicidad se debe a que es altamente reactivo, siendo uno de los electrófilos más fuertes de los sistemas biológicos, por lo que es capaz de reaccionar con macromoléculas como ácidos nucleicos, fosfolípidos básicos y proteínas, principalmente

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con grupos guanidios de la arginina (produciendo inhibición enzimática) y grupos amino de la lisina, alterando así el metabolismo celular (Zucchetti, 2018).

1.5.2 Sistema glioxalasa en plantas.

Se ha reportado que aquellas plantas con bajos niveles de MG son capaces de tolerar mejor el estrés. En plantas sometidas a estrés salino, hídrico y oxidativo por metales pesados, se ha visto un aumento en los niveles de GLY I, mientras que GLY II aumenta sus niveles en aquellas plantas sometidas a estrés por sequía, temperaturas extremas, salinidad, y metales pesados. En el caso de la *GLY III*, Ghosh *et al.* (2016) han reportado un aumento de su expresión en arroz sometido a estrés por salinidad, frío, calor, metales pesados (As y Cu) y estrés oxidativo. GLY III también puede interactuar con otras proteínas inducidas por el estrés, como el superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, esto podría indicar que cuando una planta se encuentra estresada, sus células tienen un aumento en su metabolismo primario, regulando positivamente enzimas de la glucólisis y ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Umeda *et al.*, 1994), de esta forma, el equilibrio de la glicólisis se rompería. Al aumentar la velocidad de la glucólisis también aumenta el flujo de las triosas fosfato y por lo tanto los niveles de MG, en este punto, el sistema glioxalasa es totalmente necesario para reducir los niveles de MG y así tolerar la condición estresante.

Aunque hay pocos estudios, el sistema glioxalasa también se ha visto relacionado a la respuesta ante estrés biótico, relacionando el nivel de MG y la GLY I con el ataque de fitopatógenos. Lin *et al.* (2010) encontraron relación entre la infección por *F. graminearum* y la inducción de GLY I, por otro lado, Chen *et al.* (2004) encontraron que el MG incrementaba sus niveles en genotipos de maíz susceptible al hongo *A. flavus*, mientras que los genotipos resistentes tenían una mayor actividad constitutiva de GLY I, dicho patrón se encontró también en plantas de arroz infectadas con *Nilaparvata lugens* y en plantas *Brassica* infectadas con *Sclerotinia sclerotiorum* (Sangha *et al.*, 2013).

2. JUSTIFICACIÓN.

La contaminación por microorganismos es una de las principales causas de pérdida de material vegetal en el cultivo *in vitro* de muchas plantas. Especialmente por microorganismos endófitos que son casi imposible de identificar y eliminar sin dañar a la planta, o por microorganismos que tienen gran resistencia a métodos de desinfección convencionales como el uso de etanol, hipoclorito de sodio o antibióticos. Es por eso que en años recientes se ha trabajado con otras alternativas como el uso de péptidos antimicrobianos derivados de plantas y nanopartículas metálicas de plata (AgNP) obtenidas mediante síntesis verde, que reportan una importante actividad antimicrobiana y, en el caso de los péptidos y algunas AgNP, los microorganismos no generan resistencia contra ellos.

En el presente estudio se busca comprobar la eficiencia de estas dos alternativas como antimicrobianos. Además, probar el efecto de AgNP de síntesis verde en el crecimiento y desarrollo de cactáceas *in vitro* y su efecto en los niveles de estrés de la planta, detectado como alteraciones en sus mecanismos de defensa contra estrés oxidativo. Con la finalidad de tener una alternativa de desinfección que elimine o controle la proliferación de microorganismos sobre el medio de cultivo para cactáceas que ya han sido establecidas *in vitro* pero que mantienen contaminación endófitas latente o que puedan contaminarse durante los procesos de propagación y que, por su condición de plantas con limitada distribución, sea difícil volver a establecer el cultivo *in vitro*.

Además, se busca aislar e identificar molecularmente por secuenciación de regiones ITS y 16s, algunos microorganismos endófitos de *Mammillaria bombycina in vitro*, que son muy difíciles de cultivar e identificar cuando se encuentran en latencia, pero que al cambiar alguna condición de cultivo se convierten en contaminación persistente.

3. HIPÓTESIS.

El péptido antimicrobiano analizado, y las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extractos de hojas de acelga poseen actividad antimicrobiana y pueden ser utilizados en la desinfección de explantes, produciendo además un efecto en el crecimiento y desarrollo de tejidos vegetales *in vitro*.

4. OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la capacidad antimicrobiana de péptidos de plantas y nanopartículas de plata de síntesis verde con *Beta vulgaris* var. *cicla* (*BvAgNP*) y su efecto en el desarrollo de cultivos *in vitro* de cactáceas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Evaluar la capacidad antimicrobiana de *BvAgNP* y de un péptido sintético antimicrobiano proveniente de glioxalinas de sorgo (*Sorghum bicolor*).
2. Evaluar el efecto de *BvAgNP* en el crecimiento y desarrollo de *Mammillaria bombycina* y *Hylocereus undatus in vitro*.
3. Analizar la microbiota asociada a cultivos *in vitro* de *M. bombycina* y *H. undatus* tratados con *BvAgNP*.
4. Analizar la expresión de los genes glioxalinas en *M. bombycina* y *H. undatus in vitro* tratadas con *BvAgNP*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Péptidos sintéticos antimicrobiano proveniente de glioxalzas de sorgo (*S. bicolor*).

5.1.1 Ligación de los genes sintéticos al vector pGEM® T-Easy.

Los genes sintéticos *GSUNION* de 150 pb y *GSLINK* de 240 pb (Muñoz-Carrillo, 2022) contenidos en el vector linealizado pUC 57, fueron amplificados mediante PCR con los oligonucleótidos M13 F (5' TGATAACGACGGCCAGT 3') y M13 R (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'), obteniendo amplicones de 239 y 329 pb. Los fragmentos se purificaron mediante el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean – Up System Promega. Los fragmentos se ligaron en el vector pGEM®-T Easy (Promega) según las especificaciones del fabricante.

5.1.2 Transformación genética de *E. coli* DH5α por choque térmico.

Se prepararon células competentes de *E. coli* DH5-α para la transformación como a continuación se describe; la cepa *E. coli* DH5-α se sembró en medio LB (Anexo A3) sólido a 37 °C por 20 h, posteriormente se tomó una colonia aislada y se inoculó en 5 ml de medio LB líquido incubando a 37 °C toda la noche en agitación. Se tomaron 0.1 ml del cultivo y se inocularon en 10 ml de medio LB líquido fresco, se incubó a 37 °C durante 3 h en agitación hasta observar turbidez. Transcurrido el tiempo se repartió el cultivo en 10 microtubos de 1.5 ml, se enfrió en hielo durante 10 min, se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 seg, se eliminó el sobrenadante en solución con hipoclorito de sodio y se resuspendió la pastilla suavemente con 1 ml de CaCl₂ estéril y frío. En seguida los tubos se incubaron en hielo durante 10 min, se centrifugaron a 12000 rpm por 15 seg, se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla. Finalmente, la pastilla seca se resuspendió en 30 µl de CaCl₂. Las células competentes se utilizaron inmediatamente para su transformación.

Para la transformación por choque térmico añadieron de 0.5 a 3 µl de la ligación de los genes sintéticos en el vector pGEM®-T Easy por cada 30 µl de células competentes, se mezcló con suavidad y se incubó en hielo por 20 min, posteriormente se calentó a 42 °C por 90 seg e inmediatamente se transfirió a hielo incubando por 5 min, a continuación, se añadieron 200 µl de medio LB y se incubaron a 37 °C por 45 min en agitación. Todo el cultivo obtenido se sembró mediante perlas de vidrio en una caja con medio LB sólido con ampicilina 10 mg/L, y se incubó a 37 °C toda la noche para obtener colonias transformadas.

5.1.3 Extracción de plásmidos.

Se utilizó el protocolo de Birnboim & Doly (1979) con algunas modificaciones; las colonias transformadas fueron aisladas colonia por colonia en medio LB líquido y en placa con 10 mg/L de ampicilina y se incubaron a 37 °C toda la noche. Transcurrido este tiempo se almacenaron las placas y se transfirió el medio líquido a un microtubo de 1.5 ml. La muestra se centrifugó a 12000 rpm durante 2 min y se eliminó el sobrenadante en solución de hipoclorito de sodio. A la pastilla bacteriana obtenida se le añadió 100 µl de solución Birnboim I (Anexo B7), se resuspendió suavemente con micropipeta y se incubó en hielo por 5 min, en seguida se le añadieron 200 µl de solución Birnboim II (Anexo B7), se mezcló perfectamente por inmersión y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. A continuación, se añadieron 150 µl de solución Birnboim III (Anexo B7), se mezcló vigorosamente y se incubó en hielo por 5 min para después centrifugar a 12000 rpm por 5 min. Posteriormente, se añadieron 200 µl de fenol-cloroformo (1:1) mezclando vigorosamente hasta emulsificar y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min, se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio y se adicionaron 200 µl de cloroformo- alcohol isoamílico (24:1), se emulsificó y centrifugó a 12000 rpm por 5 min. La fase acuosa se recuperó en un tubo limpio y se agregó un volumen igual de isopropanol, se mezcló durante 1 min, se incubó en hielo por 20 min y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. Finalmente, se eliminó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 200 µl de etanol al 70% y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril. La muestra se almacenó a 4 °C.

5.1.4 Verificación de la ligación mediante restricción con *HindIII* y *BamHI*.

Los plásmidos purificados fueron digeridos con las endonucleasas *HindIII* y *BamHI* de Jena Bioscience. Cada reacción contuvo 7 µl de ADN plasmídico, 1µl de Buffer H 10X, 2 unidades de *HindIII*, 2 unidades de *BamHI* y agua destilada para ajustar un volumen total de 10 µl. Se incubó por 1 h a 37 °C y se observó el resultado por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio, se reveló en transluminador de luz UV. Las construcciones pGEM®-T Easy:*UNION* y pGEM®-T Easy:*LINK* se guardaron como respaldo.

5.1.5 Digestión enzimática con *EcoRI* y *HindIII*.

Los amplicones obtenidos en el punto 5.1.1 correspondientes a los genes sintéticos *GSUNION* de 239 pb y *GSLINK* de 329 pb se digirieron con las endonucleasas *EcoRI* y

HindIII de Jena Bioscience siguiendo especificaciones del fabricante obteniendo fragmentos de 132 pb y 222. pb, además, se digirió bajo las mismas condiciones el vector pET32 a(+) para crear extremos complementarios a los genes sintéticos. Los fragmentos obtenidos se purificaron mediante el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean – Up System Promega.

5.1.6 Ligación de los genes sintéticos al vector pET32 a(+) y transformación genética de *E. coli* BL21 Rosetta.

Los fragmentos se ligaron en el vector pET32 a(+) utilizando la enzima ligasa T4 DNA Ligasa (Promega) incubando a 4 °C por toda la noche. Se realizó la transformación genética de *E. coli* BL21 Rosetta siguiendo el protocolo descrito anteriormente (punto 5.1.2). Posteriormente se extrajeron plásmidos mediante el protocolo descrito anteriormente (punto 5.1.3). La extracción se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Las construcciones obtenidas se denominaron pET32a(+):*GSUNION* y pET32a(+):*GSLINK*.

5.1.7 Verificación de la ligación mediante PCR con oligonucleótidos pET 32 y pET 33.

Se realizó una PCR de los plásmidos obtenidos en el punto anterior y vector pET32a (+) vacío como control, se utilizaron los oligonucleótidos pET32 (5' CGATGCGTCCGGCGTAGAG 3') y pET33 (5' GCTTCCTTTCGGGCTTTGTTAG 3') (Quezada-Rivera, 2018) con el kit Paq 5000 Hotstart Agilent Master Mix a una temperatura de alineamiento de 58 °C. Obteniendo amplicones de 831 pb para pET32a(+):*GSUNION*, 921pb para pET32a(+):*GSLINK* y 724 pb para el vector vacío.

5.1.8 Secuenciación de construcciones.

A las construcciones pET32a(+):*GSUNION* y pET32a(+):*GSLINK* se les dio un tratamiento con 0.5 µl de RNasa a 37 °C por 30 min, transcurrido el tiempo se purificó con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean – Up System Promega resuspendiendo con 50 µl de agua destilada en un microtubo nuevo. Las construcciones se mandaron secuenciar al laboratorio LAMBAMA en el IPICYT, San Luís Potosí, S.L.P, México. La traducción de la proteína se predijo utilizando la herramienta Translate de Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>) y el tamaño de proteína se predijo utilizando la herramienta ProtParam de Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>).

5.1.9 Inducción y extracción de proteínas totales solubles.

Colonias aisladas de *E. coli* BL21 Rosetta transformada con pET32 a(+), pET32a(+):GSUNION, pET32a(+):GSLINK y bacteria no transformada (control), se cultivaron durante toda la noche a 37 °C con agitación constante en 5 ml de medio líquido LB con ampicilina 100 mg/L, a excepción de la bacteria curada que fue cultivada en LB basal. El pre-cultivo se inoculó en 95 ml de LB con o sin ampicilina según corresponda y se incubó durante 8 h 37 °C con agitación constante hasta llegar a una $DO_{600} = 0.3$. Se tomaron alícuotas de 10 ml como muestra sin inducir. Posteriormente se añadió IPTG a concentración final de 0.1 mM, se incubó a 37 °C en agitación y se tomaron alícuotas de 10 ml a las 12, 16 y 20 h almacenándolas a 4 °C. Todas las alícuotas se centrifugaron a 10 000 rpm para eliminar el sobrenadante, la pastilla se pesó y re suspendió en buffer de lisis (8 M Urea, 100 mM NaH_2PO_4 , 100 mM Tris·Cl, pH 8) 5 ml por gramo de peso húmedo de la pastilla. Se incubaron en hielo por 15 min y se realizó la lisis por sonicación con 5 ciclos con pulsos de 30 s de lisis y 10 s de descanso. El lisado se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min, se recuperó la fracción soluble y se almacenó a - 4 °C hasta su uso.

El ensayo fue repetido con un tiempo óptimo de inducción de 20 h con IPTG 0.1 mM en un volumen de 200 ml de medio.

5.1.10 Cuantificación de proteínas totales solubles (PTS).

Las PTS se cuantificaron por el método de Bradford (Anexo B4) utilizando un estándar de albúmina sérica de bovino (BSA) (Anexo B5). Adicionalmente las muestras se analizaron mediante geles de poliacrilamida al 30% en donde se corrieron cada una de las muestras mezclando 20 μ l de muestra y 20 μ l de 2x SDS-PAGE, para cargar en el gel de poliacrilamida. Los geles se tiñeron en una solución de tinción (Azul de Coomassie R-250) durante toda la noche y se destiñeron en solución reveladora por 2 días.

5.1.11 Pruebas de capacidad antimicrobiana de péptidos sintéticos.

La capacidad antibacteriana de los péptidos sintéticos fue evaluada mediante conteo de UFC. Se utilizaron las cepas *E. coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). A partir de cultivos axenicos de cada cepa se cultivó una colonia aislada en 5 ml de medio líquido LB a 37 °C con agitación constante por 20 h. Los cultivos se llevaron a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) = 0.1 para *E. coli* y de $DO_{600} = 0.01$ para *P. aeruginosa* y *S. aureus* con una concentración de 1×10^7 UFC mL-

1. Se prepararon tratamientos para exponer 1×10^6 UFC mL⁻¹ de cada cepa contra 50 µg/ml de PTS, además de un control positivo sin extracto proteico y un control negativo con ampicilina 1000 mg/ml. A continuación, se inocularon alícuotas de 10 µl en diferentes tiempos de exposición: 0, 20, 40, 60 y 80 min, en agar LB y se incubaron a 37 °C por toda la noche. Posteriormente se contaron las UFC obtenidas y se calcularon las UFC mL⁻¹. Las pruebas se realizaron por triplicado.

5.2 Obtención de material vegetal por propagación de cactáceas *in vitro*.

El material vegetal fue donado por el Banco de Germoplasma *in vitro* de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México. Las plántulas de *M. bombycina* y *H. undatus* se utilizaron como planta madre para su propagación. Los tallos de ambas especies se cortaron de manera transversal eliminando la parte basal, pero conservando el ápice, para obtener fragmentos de aproximadamente 4 mm de grosor. Los explantes se inocularon bajo condiciones axénicas y manteniendo la polaridad del explante en frascos de vidrio con medio de cultivo Murashige and Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) preparado según indicaciones del anexo A y en el caso de *M. bombycina* se añadió 1 mg/L de benciladenina (BA) para lograr la generación de brotes. Los frascos se incubaron a 25 °C bajo un fotoperiodo de 16 h luz por 8 h de oscuridad hasta la obtención de brotes diferenciados.

5.3 Nanopartículas de plata de síntesis verde.

5.3.1 Síntesis verde de AgNP a partir de acelga.

Se utilizaron extractos de hojas frescas de *B. vulgaris* el cual se hizo reaccionar con una solución 1mM de AgNO₃ grado reactivo de JTBaker™, tal cual lo realizado por Garcidueñas-Piña *et al.* (2023). La síntesis se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Manikandan *et al.* (2017) con leves modificaciones: Veinte gramos de hojas se lavaron con agua destilada y se trituraron en licuadora durante 20 s con 100 ml de agua destilada, se colocaron en un matraz y se incubó en baño maría con agitación frecuente durante 1 h; se dejó reposar hasta llevar a temperatura ambiente y se filtró con papel filtro Whatman 1. Se colocó 90 ml de una solución de AgNO₃ 1 mM en un matraz y se adicionaron lentamente 10 ml del filtrado. Se incubó protegido de la luz, a temperatura ambiente, en agitación constante hasta observar un cambio en la coloración de amarillo a rojizo o marrón. La formación de las BvAgNP fue monitoreada mediante espectroscopia UV-visible entre 300 y

600 nm, esperando obtener un pico máximo de absorción a una longitud de onda de 420 nm, conocido como Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) característico de la excitación del plasmón superficial de las *BvAgNP*. Utilizando agua destilada como blanco.

La suspensión obtenida se sometió a centrifugación a 12,000 rpm por 10 min. El precipitado se lavó 3 veces con agua destilada estéril y una vez con etanol al 96 %, se secó a 40 °C. Las AgNP recubiertas de extractos de hojas de *B. vulgaris* (*BvAgNP*) se disolvieron en buffer de fosfatos 0.05 M pH 7 estéril, la solución se almacenó a temperatura ambiente y protegida de la luz hasta evaluar su actividad.

5.3.2 Evaluación de la capacidad antimicrobiana de *BvAgNP*.

5.3.2.1 Selección de microorganismos.

Como cepas conocidas se eligieron tres especies de hongos *Colletotrichum* sp., *Cladosporium* sp. y *Aspergillus* sp. donadas por el departamento de microbiología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, las cepas fueron cultivadas en placas con PDA. Además, se seleccionaron según su incidencia, tres microorganismos no identificados contaminantes de cultivos de cactáceas *in vitro* del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, a las cuales se les denominó “contaminante A, B y C”.

5.3.2.2 Análisis morfológicos de microorganismos contaminantes de *M. bombycina* *in vitro*.

El contaminante A se aisló en medio MS pH 5.7 incubando a 25 °C por 15 - 30 días, mientras que los contaminantes B y C se aislaron en Agar Mueller Hinton pH 6.5, incubando a 25 °C por 6 a 21 días. Se registró la morfología de sus colonias. Posteriormente se realizaron diferentes tinciones, al contaminante A se le realizó tinción simple con azul de lactofenol y se observó en microscopio óptico, mientras que a los contaminantes B y C se les realizó tinción Gram y tinción de esporas por la técnica de Schaeffer Fulton para finalmente observar en microscopio óptico.

5.3.2.3 Identificación molecular mediante 16s e ITS de microorganismos contaminantes en *M. bombycina* *in vitro*.

Los tres microorganismos seleccionados, fueron inoculados en diferentes medios hasta obtener formación de colonias, posteriormente fueron aislados: el contaminante A se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cultivó en medio MS adicionado con 0.5 mg/L de BA e incubando a 25 °C por 15 días, el contaminante B se cultivó en medio PDA a 25 °C por 21 días y el contaminante C se cultivó en medio Müeller Hinton a 25 °C por 6 días.

5.3.2.3.1 Extracción de ADN genómico de contaminante A.

Se extrajo ADN genómico total del contaminante A utilizando el método CTAB (Murray & Thompson, 1980) con algunas modificaciones. El contaminante A se inoculó en un matraz de 250 ml que contenían 50 ml de caldo Papa Dextrosa y se incubó en oscuridad por 5 días. Una vez transcurrido el tiempo, se recolectaron las células producidas centrifugando el caldo PD y desechando el sobrenadante. Aproximadamente 150 mg de precipitado se colocaron en microtubos de 1.5 ml y se añadió 800 µl de buffer de lisis (Anexo B1), las muestras se trituraron mecánicamente con vortex y se incubaron a 65 °C por 10 min agitando cada 5 min. Trascurrido el tiempo se incubaron las muestras en hielo por 5 min para después agregar 0.5 ml de fenol-cloroformo (1:1), se agitaron hasta emulsificar y se centrifugaron a 12000 rpm por 5 min. La fase acosa se recuperó en un tubo limpio y se repitió por segunda vez el tratamiento con fenol cloroformo (1:1). Nuevamente recuperada la fase acuosa en un tubo limpio, se adicionaron ahora 0.5 ml de cloroformo – alcohol isoamílico (24:1), las muestras se emulsificaron y se centrifugaron a 12000 rpm por 5 min. Nuevamente se recuperó la fase acuosa a la cual se le añadió un volumen igual de isopropanol se agitó por inversión durante 1 min y se incubó por 10 min a – 20 °C. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 0.2 ml de etanol al 70% mezclando por inversión y centrifugando a 12000 rpm por 5 min. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla para resuspenderla en 30 µl de agua destilada estéril.

El ADN extraído se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizando en el fotodocumentador de luz UV DyNA Ligt Dual Intensity UV de Labnet.

5.3.2.3.2 Identificación molecular por 16s e ITS de microorganismos contaminantes de *M. bombycina* in vitro.

Se empleó la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para la amplificación de regiones características funcionales para la identificación de microorganismos por secuenciación. Para el contaminante A se utilizó PCR con ADN

genómico, se amplificó la región ITS completa: 18 S, ITS1, 5.8 S, ITS y 28SrR del operón ribosomal, esperando un amplicón de entre 600 y 650 pb utilizando los oligonucleótidos universales ITS 1 F (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS 4 R (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (Zarrin *et al.*, 2016). Por otro lado, para los contaminantes B y C se utilizó la técnica de PCR de colonia y se amplificó la región 16 s rRNA con los oligonucleótidos F (5' CCTACGGGAGGCAGCAG 3') y R (5' GCGCTCGTTGCGGGACT 3') (Muyzer *et al.*, 1993; Fukatsu & Nikoh, 1998). Se utilizó el kit Paq5000 Hotstart Allilent en un termociclador Peltier Thermal Cycler siguiendo recomendaciones del proveedor.

Las condiciones de reacción se ajustaron como se indica: 1 primer ciclo de predesnaturalización a 94 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos: 1) desnaturalización a 95 °C por 20 seg, 2) alineamiento a 55 °C por 20 s y 3) extensión a 72 °C por 2 min, y finalmente una extensión de 5 min a 72 °C.

La amplificación se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizado en un fotodocumentador de luz UV DyNA Ligt Dual Intensity UV de Labnet.

5.3.2.3.3 Purificación y secuenciación de fragmentos amplificados.

Los fragmentos amplificados en la PCR se purificaron del gel de agarosa mediante el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean – Up System Promega.

La purificación se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizando en el fotodocumentador de luz UV DyNA Ligt Dual Intensity UV de Labnet.

Los fragmentos purificados fueron enviados al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LAMBAMA) en el IPICYT, San Luís Potosí, S.L.P para su secuenciación.

5.3.2.3.4 Análisis *in silico* de fragmentos 16s amplificados.

5.3.2.3.4.1 Alineamiento múltiple.

Se buscaron fragmentos homólogos de las regiones amplificadas, utilizando la herramienta bioinformática Basic Local Alignment Search Tool [(BLASTX) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>] (Marchler-Bauer, 2015) de la base de datos del National Center for Biotechnology Information [(NCBI) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>].

El alineamiento múltiple se realizó con la herramienta MUSCLE [http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/] con el método ClustalW, seleccionando diferentes homólogos según su nivel de similitud en la herramienta bioinformática Basic Local Alignment Search Tool [(BLAST) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>].

5.3.2.3.4.2 Construcción de dendrogramas.

Para cada contaminante se construyó un dendrograma considerando el porcentaje de identidad de secuencia en aminoácidos alineadas de diferentes géneros. Se utilizó el programa MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 (Tamura *et al.*, 2021), por el método de distancia media y utilizando bootstrap 1000.

5.3.2.4 Huella génica de microorganismos contaminantes de *M. bombycina* in vitro por REP-PCR.

Se reportó la huella génica de los contaminantes B y C mediante la técnica REP-PCR según lo reportado por (Wang *et al.*, 2020) con algunas modificaciones. Se utilizó el kit Vivantis con 50 ng de ADN y mediante los oligonucleótidos BoxAIR F 5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3'; ERIC1R 5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC 3'; ERIC2 5' AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG 3'; REP1R 5' IIIICGICGICATCIGGC 3'; REP1I 5' ICGICTTATCIGGCCTAC 3' (Whang *et al.*, 2020). Las condiciones de reacción se indican en la tabla 2. Los resultados fueron revelados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Tabla 2. Programas utilizados para REP-PCR.

Oligos	Desnaturalización inicial	35 ciclos			Extensión final
		Desnaturalización	Hibridación	Extensión	
BOX	94 °C por 3 min	94 °C por 30 s	50 °C por 1 min	72 °C por 8 min	72 °C por 16 min
ERIC	95 °C por 4 min	94 °C por 1 min	52 °C por 1 min	65 °C por 8 min	65 °C por 16 min
REP	95 °C por 4 min	94 °C por 1 min	40 °C por 1 min	65 °C por 8 min	65 °C por 16 min

5.3.2.5 Pruebas de inhibición de hongos con BvAgNP.

Se realizaron pruebas de inhibición radial de BvAgNP contra los hongos *Colletotrichum* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., los cuales fueron previamente

resembrados en Agar Papa Dextrosa (PDA) para mantenerlos activos. A partir de cultivos maduros se recolectaron esporas con la ayuda de un asa triangular, las cuales fueron suspendidas en 10 ml de buffer de fosfatos 0.05 M pH 7 estéril. La cantidad de esporas se cuantificó utilizando una cámara de Neubauer mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Esporas/ml} = \frac{\sum \text{esporas contadas}}{\text{No.de cuadrantes contados}} * \frac{25 \text{ cuadrantes}}{0.1 \text{ mm}^3} * \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}}$$

Las pruebas de inhibición radial se realizaron incubando soluciones de 10 000 esporas/ml en buffer de fosfatos 0.05 M pH 7 estéril, tratadas con *BvAgNP* a concentraciones de 100, 50 y 25 mg/ml, más un control sin *BvAgNP*, se incubó en agitación y se analizaron 3 diferentes tiempos de exposición: 30 min, 1 h y 3 h. Se inocularon alícuotas de 10 μ l en agar PD y se incubaron a 25 °C en oscuridad por 4 días. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Trascurrido el tiempo de incubación se midieron los diámetros de crecimiento de las colonias para calcular el porcentaje de inhibición radial (% IR) a partir de la siguiente fórmula (Kim *et al.*, 2012):

$$\% \text{ IR} = \frac{(D - d) * 100}{D}$$

Donde “D” es el diámetro del hongo sin tratamiento con *BvAgNP*, mientras que “d” corresponde al diámetro del hongo tratado con *BvAgNP*.

Con los datos obtenidos para %IR se realizó un análisis factorial 3² (α = 0.05). Posteriormente se realizó un análisis de varianza con ANOVA de un factor y una prueba de comparaciones múltiples con el método de Fisher (α = 0.05). Finalmente, los datos fueron graficados. Todo el análisis fue realizado en el software GraphPad Prism versión 9.0.0 (Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com),

5.3.2.6 Antibiogramas y pruebas de inhibición de microorganismos aislados de *M. bombycina* con *BvAgNP*.

A los contaminantes B y C identificados como bacterias, se les realizaron antibiogramas con sensidiscos para bacterias Gram + (PT-34 Multibac I.D) para *Mycobacterium* sp. y Gram - (PT-35 Multibac I.D) para *Methylobacterium* sp. en agar Müller-Hinton a 25 °C. Posteriormente se realizaron las pruebas de inhibición con *BvAgNP*. Se crecieron colonias aisladas en caldo Müller-Hinton a 25 °C en agitación a 160 rpm durante 6 a 20 días hasta observar crecimiento. Se recuperaron las bacterias centrifugando a 2000

rpm durante 5 min, se desechó el medio y se lavaron en buffer de fosfatos 0.05 M pH 7 estéril. Se resuspendió la pastilla en buffer de fosfatos 0.05 M pH 7 estéril para tener un título de 10^7 UFC mL⁻¹ por espectrometría DO₆₀₀. Se prepararon tratamientos para exponer 10^6 UFC mL⁻¹ con BvAgNP a concentraciones de 25, 50 y 100 mg/L, además de un control sin BvAgNP y un control con amikacina 10 mg/ml para *Methylobacterium* sp. Se inocularon alícuotas de 10 µl en diferentes tiempos de exposición: 5, 10 y 15 min, en agar Müller-Hinton y se incubaron a 30 °C por 6 - 20 días. Se contaron las UFC desarrolladas y se calcularon las UFC mL⁻¹. Las pruebas se realizaron por triplicado.

En el caso del contaminante A perteneciente a los *Actinomyces* se cultivó en medio MS, se tomó un fragmento de una colonia y se realizó un conteo celular mediante la cámara de Neubauer, el resto de la técnica se realizó tal cual lo descrito en el punto 5.3.2.5.

5.3.2.7 Pruebas de desinfección con BvAgNP de tejidos inoculados con *Mycobacterium bomby* y *Methylobacterium bomby*.

Se recolectaron pantas de *M. bombycina* *in vitro* y se inocularon con los aislados de *Mycobacterium bomby* y *Methylobacterium bomby*. Se cultivaron en medio PDA durante 7 días para aumentar el crecimiento del contaminante. Se realizó un lavado con agua destilada estéril y cloruro de benzalconio al 0.1% durante 5 min con agitación, para quitar el exceso de contaminante, posteriormente se enjuagó con abundante agua estéril y se secó en gasa. Se realizó un segundo lavado en etanol al 70% durante 40 s y enjuague en agua destilada estéril. Los explantes fueron sembrados en medio MS adicionado con diferentes concentraciones de BvAgNP (100 mg/L, 50 mg/L y 25 mg/L), como control se utilizó medio MS basal, además de un segundo control en el cual posterior al lavado con etanol al 70% se realizó un tercer lavado con hipoclorito de sodio al 0.5% durante 5 min enjuagando con abundante agua destilada estéril, los explantes fueron sembrados en medio MS basal.

Posteriormente las plantas se incubaron bajo condiciones axénicas a 25 °C bajo un fotoperiodo de 16 h luz por 8 h de oscuridad durante 90 días. Transcurrido el tiempo, se registró la presencia o ausencia del contaminante en los diferentes tratamientos. Se extrajeron los explantes y se enjuagaron en agua destilada estéril con agitación durante 20 min. Se trituraron las plantas completas en mortero, se diluyó en buffer de fosfatos 0.05 M pH 7 estéril. Se inoculó el extracto a concentración conocida y el agua de lavado, en medio

Müller-Hinton para las bacterias y Müller-Hinton para los hongos. Finalmente se incubó a 30 °C por 5 o 25 días y se contaron las UFC. Los análisis se realizaron por triplicado.

5.3.2.8 Pruebas de adaptación en suelo de *M. bombycina* inoculada con *Methylobacterium bomby*.

Para evaluar el efecto de *Methylobacterium bomby* como promotora de crecimiento y desarrollo, plántulas de *M. bombycina in vitro* fueron extraídas del medio MS, se eliminaron residuos del medio de cultivo de la raíz con agua corriente y posteriormente se inocularon humedeciendo las raíces por 10 seg en una solución de *Methylobacterium bomby* con una DO₆₀₀ de 0.4 A en Buffer de fosfatos 0.1 mM pH 7, para el tratamiento control se utilizó Buffer de fosfatos 0.1 mM pH 7 sin bacteria. Finalmente 10 plántulas por tratamiento se sembraron por separado en sustrato, se cubrieron con una bolsa y se inocubaron a 25 °C con fotoperiodos de 16 h luz y 8 h oscuridad por 15 días, durante los cuales se hicieron perforaciones para facilitar su aclimatación, transcurrido el tiempo se retiró la bolsa y se continuó la incubación durante 75 días con riego cada tercer día. Finalmente se sacaron de tierra y se reportó longitud y diámetro de tallo, longitud de raíz.

5.3.3 Efectos de BvAgNP en el crecimiento y desarrollo de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro*.

5.3.3.1 Efectos de BvAgNP a altas concentraciones en el crecimiento y desarrollo de *H. undatus in vitro*.

Se evaluó la respuesta en el crecimiento y desarrollo de *H. undatus in vitro* a diferentes concentraciones de BvAgNP con el objetivo de seleccionar las concentraciones aptas para posteriores análisis. Se utilizaron tallos de *H. undatus in vitro* que fueron cortados de forma transversal en fragmentos de aproximadamente 5 mm de espesor. Las pruebas se realizaron en frascos con medio MS adicionados con diferentes concentraciones de BvAgNP (100, 200, 500 y 1000 mg/L), y un control sin BvAgNP. Los experimentos se realizaron por triplicado por explante. Los frascos fueron cultivados bajo condiciones axénicas a 25 °C bajo un fotoperiodo de 16 h luz por 8 h de oscuridad por 90 días. Transcurrido el tiempo se registró elongación de explante, brotación, enraizamiento y longitud de las raíces.

5.3.3.1.1 Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopía de rayos X de energía dispersa (EDS) en *H. undatus in vitro* a concentraciones altas de BvAgNP.

Se realizó un análisis MEB de las raíces y tallos de los explantes tratados con 1000 mg/L de BvAgNP comparando contra los explantes control sin BvAgNP, para esto se realizaron cortes en fresco de las muestras para analizar la parte externa e interna de tallo y raíz en el microscopio óptico de barrido de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Además, se realizó un análisis de elementos por EDS en algunas zonas externas del tallo y en la parte interna de la raíz de los explantes de *H. undatus* tratados con 1000 mg/L de BvAgNP comparando con los explantes control.

5.3.3.2 Tratamientos de BvAgNP en *M. bombycina* y *H. undatus*.

Se realizan ensayos para evaluar los efectos de BvAgNP en el crecimiento y desarrollo de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro*. Para esto se utilizaron tallos crecidos *in vitro* de *M. bombycina* y *H. undatus* que fueron cortados de forma transversal obteniendo fragmentos de 5 mm de espesor. Las pruebas se realizaron en frascos con medio MS, cada uno de los cuales tuvo concentración diferente de BvAgNP: 100 mg/L, 50 mg/L y 25 mg/L, más un control con medio MS basal, los experimentos se realizaron con 5 repeticiones. En cada concentración se inocularon 3 explantes de *M. bombycina* o *H. undatus* bajo condiciones axénicas para posteriormente cultivarlos a 25 °C bajo un fotoperiodo de 16 h luz por 8 h de oscuridad hasta la obtención de resultados visibles.

Transcurridos 90 días de incubación, los explantes fueron extraídos del medio de cultivo para realizarles diferentes análisis. La evaluación de peso húmedo, elongación de explante, brotación, longitud de brotes, formación de callo, enraizamiento y contaminación se realizó a los 15 explantes por tratamiento. Posteriormente, 9 explantes por tratamiento fueron destinados a la evaluación de actividad catalasa y análisis de expresión de genes glioxalasa, 3 explantes por tratamiento se destinaron a la evaluación de colorantes clorofila y betalainas, mientras que los últimos 3 explantes se destinaron al análisis de morfología microscópica.

5.3.3.2.1 Evaluación de características físicas de *M. bombycina* y *H. undatus* *in vitro* tratadas con BvAgNP.

A los explantes tratados con diferentes concentraciones de BvAgNP (25, 50 y 100 mg/L) se les realizaron diferentes mediciones después de los 90 días de incubación. El peso húmedo se registró por cada 3 explantes comparando con el peso inicial para obtener el peso húmedo ganado por los explantes. La brotación se evaluó mediante el número de brotes totales por tratamiento y la longitud de éstos, al igual que el enraizamiento. La formación de callo y la contaminación se evaluó como presencia o ausencia. Todas las mediciones de longitud se realizaron utilizando el software ImageJ® 1.43u (Abràmoff *et al.*, 2004; Ferreira y Rasband, 2015) utilizando como escala 1 cm.

5.3.3.2.2 Evaluación del contenido de clorofila de *M. bombycina* y *H. undatus* *in vitro* tratadas con BvAgNP.

Para determinar el contenido de clorofila en plantas tratadas con BvAgNP a diferentes concentraciones (25, 50 y 100 mg/L) y comparando con el control sin BvAgNP, se incubaron 50 mg de planta en 10 ml de etanol al 96% v/v a 4 °C en oscuridad por 3 días. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia del extracto a una longitud de onda de 665 y 649 nm (A_{665} y A_{649}) en un espectrofotómetro UV-Vis (Termo scientific Genesys 10S UV-Vis). Los experimentos y las mediciones se realizaron por triplicado. Considerando las absorbancias se calculó el contenido total de clorofila mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila a (Cla)} = (13.95)(A_{665}) - (6.88)(A_{649})$$

$$\text{Clorofila b (Clb)} = (24.96)(A_{649}) - (7.32)(A_{665})$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Cla} + \text{Clb}$$

5.3.3.2.3 Evaluación del contenido de betalainas de *M. bombycina* y *H. undatus* *in vitro* tratadas con BvAgNP.

Para evaluar el contenido de betalainas en las plantas tratadas con BvAgNP a diferentes concentraciones (25, 50 y 100 mg/L) y comparando con un control sin BvAgNP, se incubaron 50 mg de planta en 10 ml de buffer de fosfatos 0.05 M pH 6, a 4 °C durante 24 h en oscuridad (Flores-Mancha *et al.*, 2019). Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia del extracto a una longitud de onda de 536 para betacianinas (Bt) y 485 nm para betaxantinas (Bx) (A_{536} y A_{485}) con un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific

Genesys 10S UV-Vis). Los experimentos y las mediciones se realizaron por triplicado. Las unidades relativas de betalainas fueron calculadas mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Betalainas (mg/L)} = (A)(DF)(MW)(1000) / (\epsilon) (i)$$

Donde A = A₅₃₆ o A₄₈₅; DF= factor de dilución; MW= peso molecular (550 g/mol para betacianinas o 339 g/mol para betaxantinas); ϵ = coeficiente de extinción molar (L/ mol cm) (60 000 para betacianinas o 48 000 (para betaxantinas); y i = longitud de la celdilla (cm) (Wruss, *et al.*, 2015).

5.3.3.2.4 Evaluación de la actividad catalasa de *M. bombycina* y *H. undatus* in vitro tratadas con BvAgNP.

Para determinar la actividad catalasa en las plantas tratadas con BvAgNP a diferentes concentraciones (25, 50 y 100 mg/L) y comparando con un control sin BvAgNP, se pulverizó el tejido vegetal en un mortero con N₂, aproximadamente 100 mg de tejido fue colocado en un microtubo de 1.5 ml y homogeneizado con 1 ml de buffer de extracción de proteínas (Anexo B3), se centrifugó en frío durante 15 min a 6 g, el sobrenadante fue recuperado (extracto proteico) y se le determinó la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford (1976) (Anexo B4), midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm y usando BSA como estándar (Anexo B5). Por otro lado, la actividad catalasa fue evaluada mediante la técnica de Aebi *et al.*, (1982) con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. A 400 μ l de buffer de reacción (Anexo B6) se añadieron 100 μ l de extracto proteico y se midió la absorbancia a los 10, 40 y 70 s después de realizada la mezcla, a una longitud de onda de 240 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis) usando como blanco la celdilla vacía. Las mediciones y los experimentos se realizaron por triplicado, considerando 3 explantes por repetición. Los resultados se reportan como unidades de catalasa (CAT), que representan la degradación del H₂O₂ en mM por minuto por mg de proteína.

5.3.3.2.5 Evaluación de morfología microscópica de *M. bombycina* y *H. undatus* in vitro tratadas con BvAgNP.

Las plantas tratadas con BvAgNP fueron procesadas para su estudio morfológico en el laboratorio de Histología y embriología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes bajo la supervisión de la Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña, siguiendo la técnica

histológica para tejido vegetal con algunas adecuaciones. Primeramente, las muestras fueron fijadas con solución FAA (formaldehido-alcohol etílico-ácido acético glacial-agua destilada, 1:5:0.5:3.5) por al menos 72 h. Posteriormente se seleccionó tallo y raíz en el caso de *M. bombycina* y tallo, raíz y brotes en el caso de *H. undatus*. Se continuó con la deshidratación de los tejidos comenzando con inmersión en agua destilada, y continuando con etanol al 70, 80 y 96%, posteriormente se realizó el aclaramiento con xilol y la infiltración en parafina, todo lo anterior realizado en un lapso de 12 h en un procesador de tejidos automatizado Leica TP 1020. A continuación, las muestras fueron incluidas en bloques de parafina y cortadas transversalmente con un grosor de 16 µm con un microtomo rotatorio Leica RM 2125RT, los cortes histológicos fueron colocados en portaobjetos y deshidratados a 65 °C para su fijación. Una vez deshidratado el tejido, se desparafinó con xilol 100% por 5 min más 3 lavados de 1 min, y luego se rehidrató con etanol 100% por 1 min 2 veces, etanol 96% por 1 min 3 veces y etanol 50% por 5 min. La tinción se realizó con safranina y azul de alcian como se describe a continuación:

<u>Para tallo:</u>		<u>Para raíz:</u>	
Safranina	30 min	Safranina	40 min
Agua	1 min	Agua	1 min
Azul de alcian	1 min	Azul de alcian	30 s
Agua	1 min	Agua	1 min
Etanol 96%	1 min	Etanol 96%	1 min
Etanol 96%	1 min	Etanol 96%	1 min
Xilol	1 min	Xilol	1 min
Xilol	1 min	Xilol	1 min

Finalmente se realizó el montaje con resina sintética dejando secar toda la noche. Los cortes fueron analizados y fotografiados en un microscopio óptico con cámara acoplada.

5.3.3.2.6 Análisis por MEB y EDS de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro* tratadas con BvAgNP.

Se realizaron cortes transversales de tallo y raíz de *M. bombycina* y *H. undatus* tratados con 100, 50 y 25 mg/L de BvAgNP y control sin BvAgNP siguiendo la técnica histológica antes descrita, hasta la desparafinación del tejido y posterior deshidratación con

etanol 96%. Las muestras obtenidas se sometieron a análisis MEB en el microscopio óptico de barrido de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Además, se realizó un análisis de elementos por EDS en algunas zonas seleccionadas de tallo y raíz de *M. bombycina* y *H. undatus* tratados con BvAgNP comparando con los explantes control.

5.3.4 Análisis de la microbiota asociada a cultivos *in vitro* de *M. bombycina* y *H. undatus* tratados con BvAgNP.

5.3.4.1 Cuantificación de microorganismos por cuenta viable de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro* tratadas con BvAgNP.

Se tomaron explantes de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro* incubados en medio MS con 25, 50 y 100 mg/L de BvAgNP por 90 días y se les dio un enjuague con agua destilada por 5 min y etanol 70% por 1 min y agua destilada por 1 min para eliminar todos los microorganismos de la superficie, se tomaron 100 µl de la última agua de enjuague y se cultivaron en placa de PDA para asegurar la esterilidad de la superficie. Posteriormente, se inocularon 100 µl de la primera agua de enjuague para cuantificar la carga microbiana externa de la planta. Por otro lado, 1 gramo de planta se maceró en 9 ml de agua destilada estéril, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas hasta una dilución final 10^7 , se inocularon 100 µl de muestra en placas de PDA para cuenta total de hongos, agar extracto de levadura y peptona (PY) para bacterias y agar extracto de levadura de peptona y dextrosa (YPD) para levaduras. Se incubó a 30 °C por 5 días las placas con PY y a 25 °C por 7 días las placas de PDA. Y finalmente se realizó conteo de unidades formadoras de colonia (UFC).

5.3.5 Análisis de expresión de genes glioxalasa en *M. bombycina* y *H. undatus in vitro* tratadas con BvAgNP.

5.3.5.1 Identificación de genes glioxalasa en *H. undatus*.

Para la identificación de genes glioxalasa en *H. undatus* se utilizaron como referencia secuencias de *M. bombycina* y oligonucleótidos glioxalasa reportados por Enríquez-González *et al.* 2022.

5.3.5.1.1 Amplificación de fragmentos de glioxalasa en *H. undatus* por PCR.

Diferentes oligonucleótidos de *M. bombycina* pertenecientes a los tres tipos de glioxalasa (Gly I, Gly II y GlyDJ-I) fueron probados para realizar la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de diferentes fragmentos de glioxalasa en *H. undatus*. Se utilizó el kit Paq 5000 Hotstart Agilent Master Mix en un termociclador Peltier Thermal Cycler. Se utilizaron 10 µl de Master Mix, 7 µl de agua estéril, 1 µl de producto de ADN extraído y 1 µl de cada oligonucleótido (sentido y antisentido). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 1 primer ciclo de predesnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos: 1) desnaturalización a 94 °C por 1 min, 2) alineamiento a 50 °C por 2 min y 3) extensión a 75 °C por 3 min, y finalmente una extensión de 4 min a 75 °C.

La amplificación de los diferentes fragmentos se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizado en un fotodocumentador de luz UV DyNA Ligt Dual Intensity UV de Labnet.

5.3.5.1.2 Purificación y secuenciación de genes glioxalasa en *H. undatus*.

Los fragmentos amplificados en la PCR se purificaron a partir del gel de agarosa 1% mediante el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean – Up System Promega.

La purificación se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizando en el fotodocumentador de luz UV DyNA Ligt Dual Intensity UV de Labnet, posteriormente se cuantificó la concentración y pureza de la extracción por espectrofotometría con un nanodrop Colibri Microvolume Spectrometer a longitudes de onda 260 y 280 nm.

Los fragmentos purificados fueron enviados para su secuenciación al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LAMBAMA) en el IPICYT, San Luís Potosí, S.L.P, México para su secuenciación, la región obtenida fue denominada HuGlyI-I.

5.3.5.1.3 Identificación *in silico* de genes glioxalasa II y DJ-I en *H. undatus*.

Debido a que de los amplicones obtenidos en el punto 5.3.5.1.2 solo fueron adecuados para *Gly I-I*, se implementó una segunda estrategia de identificación *in vitro* de genes *Gly II* y *Gly DJ-I* en *H. undatus*. Para esto, se realizó un alineamiento con el genoma de *Selenicereus undatus* (assembly ASM1758966v1) reportado en la base de datos NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando como referencia las secuencias *MbGlyII-I* y *MbGlyDJ-I* del transcriptoma de *M. bombycina* (Enríquez- González *et al.* 2021) para encontrar las regiones correspondientes a las proteínas glioxalasa II y glioxalasa DJ-I (III) en *Selenicereus undatus*, también conocida como *H. undatus*. Se obtuvieron regiones de ADN de 6784 pb y 4086 pb respectivamente, a partir de las cuales se obtuvieron las regiones codificantes que fueron denominadas *HuGlyII* y *HuGlyDJI* respectivamente, utilizando FGENESH (<http://www.softberry.com>).

5.3.5.1.4 Caracterización *in silico* de secuencias glioxalasa en *H. undatus*.

Las proteínas predichas de la región secuenciada (punto 5.3.5.1.2) correspondiente a *HuGlyI-I*, y las regiones obtenidas *in silico* de *HuGlyII* y *HuGlyDJ-I* (punto 5.3.5.1.3), se obtuvieron utilizando FGENESH (<http://www.softberry.com>), posteriormente se identificó la presencia de dominios utilizando la plataforma InterPro de EMBL-EBI (Blum *et al.*, 2020). Y se realizó un modelado 3D de la estructura terciaria de las proteínas predichas utilizando la herramienta SWISS-MODEL Workspace de Expasy (Waterhouse *et al.*, 2018), se compararon las estructuras predichas contra los templados en el Software Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, y Informatics de la Universidad de California, San Francisco).

5.3.5.2 Diseño *in silico* de oligonucleótidos para qPCR de Glioxalasa en *H. undatus*.

A partir de la región codificante de cada fragmento correspondiente a *Gly I-I* (obtenida *in vitro*), *Gly II-I*, *Gly II-III* y *Gly DJ-I* (obtenidas *in silico*), se diseñaron oligonucleótidos para glioxalasa de *H. undatus*, siguiendo las características de oligonucleótidos para qPCR, utilizando la herramienta Primer Designing Tool de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

5.3.5.3 Análisis de expresión de genes glioxalasa en *M. bombycina* y *H. undatus in vitro* tratadas con nanopartículas.

Los explantes de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro* a los cuales se les dio tratamiento con *BvAgNP* (punto 5.3.3.2), fueron utilizados posteriormente para realizar análisis de expresión de genes glioxalasa. La expresión tras los tratamientos fue detenida inmediatamente con nitrógeno líquido, se separó entre tallo y raíces para posteriormente macerar en mortero. El tejido pulverizado se almacenó a -70 °C hasta la extracción de RNA.

5.3.5.3.1 Extracción de RNA total de *M. bombycina* y *H. undatus* tratadas con BvAgNP.

La extracción de RNA total de los explantes de cactáceas tratadas con BvAgNP se realizó por triplicado, con 3 explantes por repetición, y utilizando el protocolo propuesto por Rajakani *et al.* (2013) con ligeras modificaciones realizadas en el laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Los explantes fueron congelados de inmediato con N₂ líquido y pulverizados, aproximadamente 50 mg de tejido fueron homogeneizados con 1 ml de buffer de lisis para extracción de RNA (Anexo B2) en microtubos de 1.5 ml, agitando vigorosamente por 1 min, en seguida se incubaron por 15 min a 65 °C mezclando cada 2 min. Transcurrido el tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les realizó una extracción con 1 vol de cloroformo- alcohol isoamílico (24:1 v/v), agitando vigorosamente hasta homogeneizar y se centrifugó a 12 000 rpm durante 20 min; la fase acuosa fue recuperada en un tubo limpio y se realizó una segunda extracción con 1 vol de fenol- cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v) agitando hasta homogeneizar, se centrifugó a 12 000 rpm durante 20 min; la fase acuosa fue recuperada nuevamente en un tubo limpio y se realizó una tercera extracción con 1 vol de cloroformo- alcohol isoamílico (49:1 v/v), se agitó vigorosamente y centrifugó a 12 000 rpm durante 20 min; se recuperó la fase acuosa y se agregó cloruro de litio (LiCl) a una concentración final de 3 M incubando a 4 °C toda la noche para precipitar el RNA. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 30 min a 4 °C, y se desechó el sobrenadante, a la pastilla obtenida se agregaron 0.5 ml de cloruro de Litio 2 M y se centrifugó 5 min a 13000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida con 300 µl de agua desionizada estéril, 1/10 de vol de Acetato de sodio 3 M (30 µl) y 2.5 vol de etanol absoluto (750 µl), se mezcló suavemente e incubó a -70 °C por 30 min. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y se desechó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 500 µl de etanol al 75% para finalmente resuspenderla en 30 µl de agua desionizada estéril tratada con DEPC.

La integridad del RNA obtenido se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. La concentración y la pureza se analizaron por espectrofotometría en NanoDrop 2000 (Thermo scientific) a longitudes de onda de 260 y 280 nm.

5.3.5.3.2 Síntesis de cDNA de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro* tratadas con BvAgNP.

El RNA extraído en el punto anterior fue tratado primeramente con DNAsa (RQ1 RNasa-Free DNasa Promega) para degradar posibles remanentes de ADN en las muestras, la reacción se realizó para aproximadamente 200 – 600 ng de RNA de la manera siguiente:

RNA	200 – 600 ng
RQ1 RNasa-Free DNasa 10X Buffer	1µl
RQ1 RNasa-Free DNasa	1µl
Agua libre de nucleasas	X µl
Volumen total	10 µl

Se incubó a 37 °C por 30 min, posteriormente se colocó 1µl de RQ1 DNasa Stop y se incubó a 65 °C por 10 min.

Una vez realizado el tratamiento, se sintetizó el cDNA utilizando el kit Radiant™ cDNA Shynthesis Kit – 1 Step, siguiendo instrucciones del fabricante, teniendo la siguiente mezcla de reacción:

5X cDNA Synthesis Mix	4 µl
20X RTasa	1 µl
RNA	4pg – 4 µg
Agua libre de nucleasas	x µl
Volumen total	20 µl

Se incubó por 30 min a 42 °C y posteriormente por 15 min a 85 °C, para desnaturalizar la RTasa. La concentración y la pureza del cDNA se analizaron por espectrofotometría en NanoDrop 2000 (Thermo scientific), Finalmente la concentración de cDNA fue ajustada a 100 ng/µL.

5.3.5.3.3 Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real (qPCR) de genes glioxalasa de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro* tratadas con BvAgNP.

Para el análisis de expresión se empleó el método de qPCR, el cual se realizó en el Laboratorio de Electrofisiología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes bajo la supervisión de la Dra. Raquel Guerrero Alba.

Se seleccionaron para el análisis los genes *Gly I-I*, *Gly II-I*, *Gly II-III* y *Gly III (GlyDJ-I)*. Para *M. bombycina* se utilizaron los oligonucleótidos propuestos por Enríquez- González *et al.* (2022) MBGLYI-I F (5' CTATTTCTTCGTTTAGGTGC 3') R (5' GAGAACAACCTGAAACCGAT 3'), MBGLYII-I F (5' CGTCCTTAACAGATGAGACA 3') R (5' TACTGCGTAAATGAGCTACG 3'), MBGLYII-III F (5' AGCCGACTAGAGTTTATTGT 3') R (5' CAATGGTTGAAGGAACAGTT 3') y MBDJ-1 F (5' GGAGCCGGAGCCAATAGACC 3') R (5' TCACTCAGAATGTTACACGGATGC 3'). Para *H. undatus* se utilizaron los oligonucleótidos diseñados *in silico* (punto 5.3.5.2) (Tabla 16). Como control se utilizó el transcrito del 25S ribosomal a partir de los oligonucleótidos F (5' CGTAAGGCGTAAGGAAGCTG 3') y R (5' TCGGAGGGAACCAGCTACTA 3'), con una temperatura de alineamiento de 60 °C.

Para la reacción se realizó en un termociclador CFX96 TM Real-Time system C1000 Touch Thermal Cycler (BIORAD), y utilizando el kit comercial Green Lo-ROX qPCR (Radiant Molecular Tools) de la siguiente manera:

Radiant Green 2X qPCR Master Mix Lo-ROX	10 µl
Oligonucleótido Forward (100µM)	0.08 µM
Oligonucleótido Reverse (100µM)	0.08 µM
cDNA	90 ng
Agua libre de nucleasas	X µl
Volumen total	20 µl

Siguiendo las condiciones de amplificación recomendadas por el kit: Desnaturalización inicial de 95 °C por 2 min, y 39 ciclos con una desnaturalización de 95 °C por 5 s y un alineamiento y extensión de 60 °C por 30 s.

5.4 Análisis estadístico.

Para los diferentes resultados se realizó un análisis estadístico en el programa R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) mediante ANOVA de un factor o de dos factores según corresponda y una prueba de comparación múltiple por el método de Tuckey ($\alpha=0.05$). Los datos obtenidos de la expresión de genes glioxalasa por qPCR fueron previamente normalizados respecto al control y gen de referencia por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), posteriormente se realizó una comparación múltiple de tratamientos por el método de Kruskal-Wallis usando los criterios de la prueba de Fisher ($\alpha=0.05$). Para los diferentes análisis se graficó la media de las repeticiones con su desviación estándar

utilizando GraphPad Prism versión 8.4.2 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU., www.graphpad.com).



6. RESULTADOS.

6.1 Péptidos sintéticos antimicrobiano proveniente de glioxalastas de sorgo (*S. bicolor*).

6.1.1 Ligación de los genes sintéticos al vector pGEM[®] T-Easy y transformación genética de *E. coli* DH5 α por choque térmico.

Se amplificó mediante PCR con oligonucleótidos M13, los fragmentos correspondientes a los genes que codifican para los péptidos sintéticos provenientes de glioxalastas de Sorgo *GSUNION* (239 pb) y *GSLINK* (329 pb) (Muñoz-Carrillo, 2022) que se tenían contenidos en un vector pUC 57 (Figura 5). Posteriormente fueron ligados al vector de expresión pGEM, [®]-T Easy de Promega las construcciones denominadas pGEM [®]-T Easy: *GSLINK* y pGEM [®]-T Easy: *GSUNION*, fueron utilizadas para transformar *E. coli* DH5 α para poder obtener mayor cantidad de los genes sintéticos y facilitar su almacenamiento para posteriores aplicaciones.

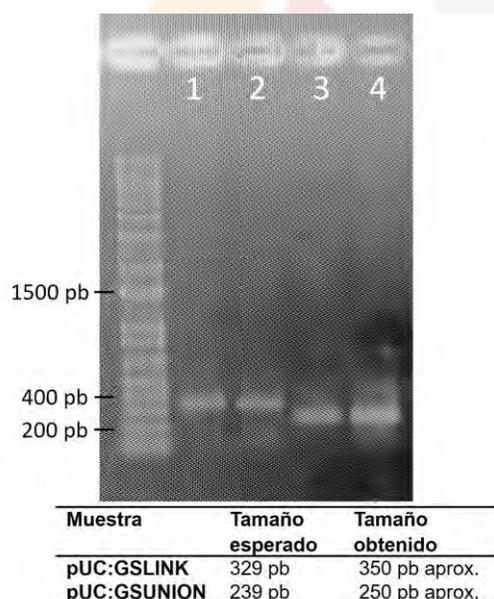


Figura 5. PCR de *GSLINK* y *GSUNION* a partir de pUC57 con oligonucleótidos M13. MPM 1 kb Plus DNA Ladder; 1-2) *GSLINK*; 3-4) *GSUNION*.

6.1.2 Verificación de la ligación a pGEM ®-T Easy mediante restricción con *Hind*III y *Bam*HI.

La ligación y transformación se corroboró mediante la extracción de plásmidos y digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. El sitio de restricción para *Bam*HI se encuentra en uno de los extremos los genes sintéticos, por lo que linealiza el vector, esperando un peso de 3254 pb para pGEM ®-T Easy: *GSUNION* y de 3344 pb para pGEM ®-T Easy: *GSLINK*. Por otro lado, el sitio de restricción de *Hind*III además de contenerse a uno de los extremos de cada péptido, se encuentra en el fragmento del vector pUC 57 conservado tras la PCR, por lo que libera los insertos del vector (Figura 6) en fragmentos esperados de 171 pb para *GSUNION* y de 261 pb para *GSLINK*. Las colonias transformadas con las construcciones fueron almacenadas como respaldo.

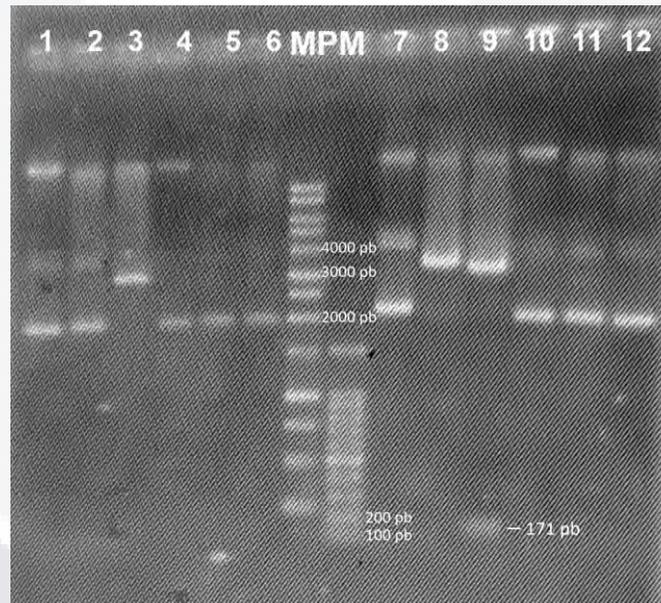


Figura 6. Digestión enzimática con *Bam*HI y *Hind*III de genes sintéticos *GSUNION* y *GSLINK*.
 1) pGEM ®-T Easy: *GSLINK*, 2) Digestión con *Bam*HI de pGEM ®-T Easy: *GSLINK*, 3) Digestión con *Hind*III de pGEM ®-T Easy: *GSLINK*, 4 y 10) pGEM ®-T Easy, 5 y 11) Digestión con *Bam*HI de pGEM ®-T Easy, 6 y 12) Digestión con *Hind*III de pGEM ®-T Easy, 7) pGEM ®-T Easy: *GSUNION*, 8) Digestión con *Bam*HI de pGEM ®-T Easy: *GSUNION*, 9) Digestión con *Hind*III de pGEM ®-T Easy: *GSUNION*. MPM 1 kb Promega y 100 pb Promega.

6.1.3 Ligación de los genes sintéticos al vector pET-32a (+) y transformación genética de *E. coli* BL21 Rosetta por choque térmico.

Por otro lado, se amplificó nuevamente mediante PCR los fragmentos correspondientes a los genes que codifican para los péptidos sintéticos provenientes de glioxalastas de Sorgo obteniendo amplicones de 239 pb y 329 pb para *GSUNION* y *GSLINK* respectivamente (Figura 7). Los amplicones fueron digeridos con *EcoRI* y *Hind III* obteniendo fragmentos de 230 y 150 pb para *GSUNION* y *GSLINK* respectivamente (Figura 5), por lo que fue posible su ligación al vector pET-32a (+) y las construcciones obtenidas se utilizaron para transformar *E. coli* BL21 Rosetta.

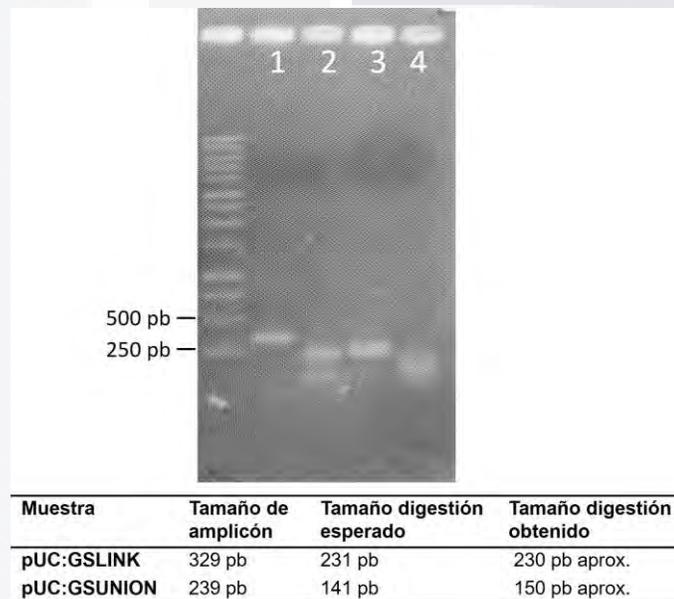
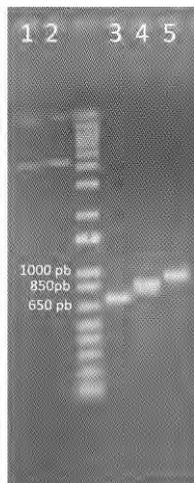


Figura 7. Digestión de *GSLINK* y *GSUNION* con *EcoRI* y *Hind III*. MPM 1 kb Promega; 1) PCR *GSLINK*; 2) digestión *GSLINK*; 3) PCR *GSUNION*; 4) digestión *GSUNION*.

6.1.4 Verificación de la ligación de los genes sintéticos al vector pET-32a (+) mediante PCR.

La ligación y transformación se corroboró mediante la extracción de plásmidos y PCR con los oligonucleótidos F (5' CGATGCGTCCGGCGTAGAG 3') R (5' GCTTCCTTTCGGGCTTTGTTAG 3') (Quezada-Rivera *et al.*, 2018) (Figura 8). Se obtuvieron amplicones de 750 pb para el vector vacío, 850 pb para la construcción pET-32a(+):*GSUNION* y de 950 pb para la construcción pET-32a(+):*GSLINK* (Figura 8).



Muestra	Tamaño esperado	Tamaño obtenido
pET32	724 pb	750 pb
pET32:GSUNION	831 pb	850 pb
pET32:GSLINK	921 pb	950 pb

Figura 8. Ligación de genes sintéticos *GSUNION* y *GSLINK* al vector pET-32a (+). 1) Extracción de plásmidos PET-32a(+):*GSUNION*. 2) Extracción de plásmidos PET-32a(+):*GSLINK*, MPM 1 kb Plus DNA Ladder 3) PCR con oligonucleótidos pET 32 y 33 de vector vacío 4) PCR con oligonucleótidos pET 32 y 33 de construcción PET-32a(+):*GSUNION* 5) PCR con oligonucleótidos pET 32 y 33 de construcción PET-32a(+):*GSLINK*.

6.1.5 Verificación de la ligación de *GSUNION* y *GSLINK* al vector pET-32a (+) mediante secuenciación.

Los plásmidos extraídos, tratados con RNAsa y purificados se secuenciaron, obteniendo secuencias de 276 y 412 pb, donde se contienen los genes sintéticos *GSUNION* (Figura 9) y *GSLINK* (Figura 10) flanqueados por los sitios de restricción pertenecientes a *EcoRI* y *Hind III*, seguidas de regiones del vector PET-32a (+). La traducción *in silico* confirma el marco de lectura correcto para la expresión de la proteína, manteniendo sus elementos básicos como el codón de inicio, las colas de histidinas, el sitio enteroquinasa, y el codón paro. La secuencia de aminoácidos perteneciente al péptido *GSUNION* obtenida de la traducción *in silico* corresponde a la diseñada por Muñoz-Carrillo (2022) (Figura 9). Sin embargo, la secuencia perteneciente al péptido *GSLINK* no corresponde a la diseñada por Muñoz-Carrillo (2022), cambiando una glicina (G) por un ácido aspártico (D) de la primera región espaciadora y una fenilalanina (F) por una isoleucina (I) en el tercer péptido glioxalasa (Figura 10).

>GSUNION

CLYGGRVGGVVPCHTKGHISYYVTSIRKFFGHGRAKAV

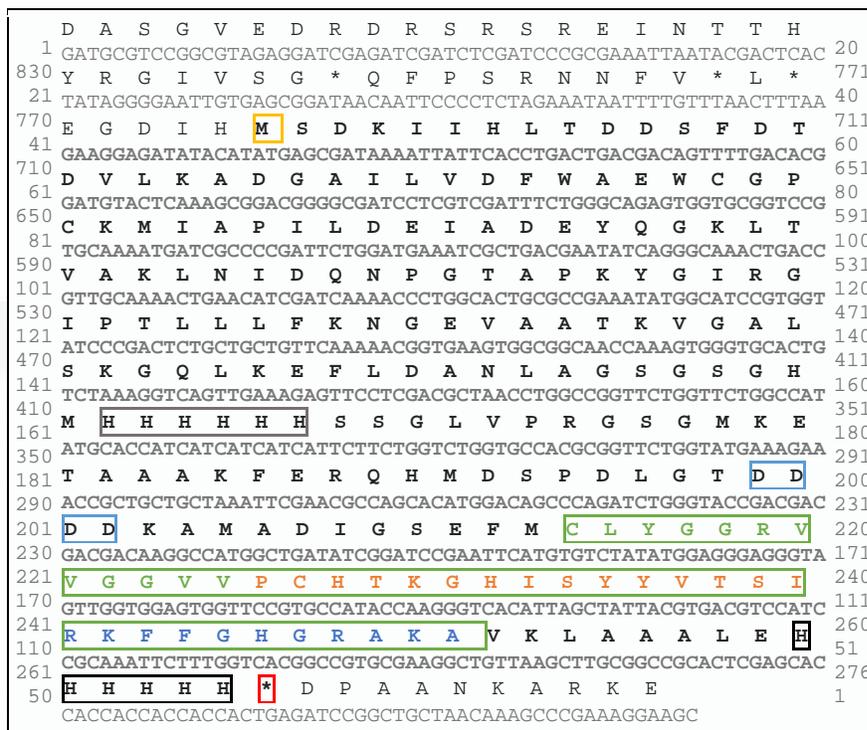


Figura 9. Secuenciación de construcción PET-32a(+):GSUNION. Se indica en el recuadro amarillo la metionina inicial, en gris la cola de histidinas, en azul el sitio enteroquinasa, en verde el péptido GSUNION y en rojo el codón paro.

>GSLINK

CLYGGRVVGVVGGGSGGGGSGGGGSPCHTKGHISYVVTSGGGSGGGGSGGGGSIKRFKFGHGRAKAV

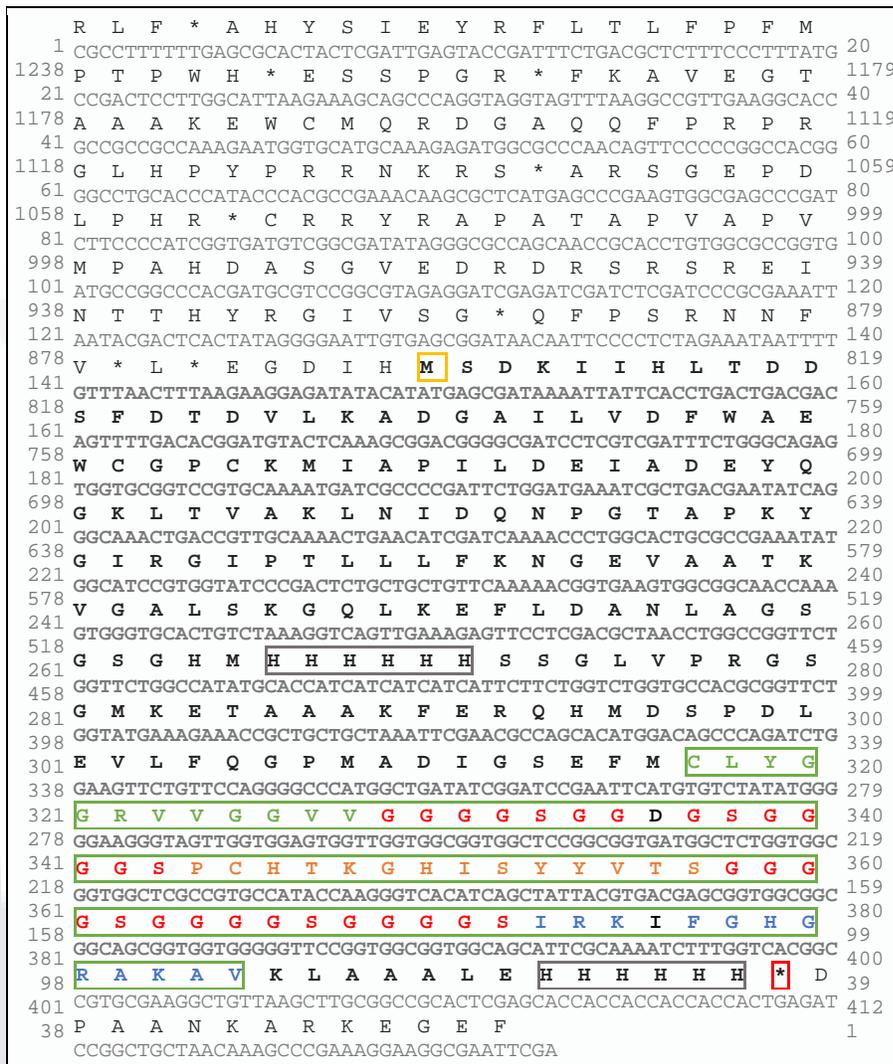


Figura 10. Secuenciación de construcción PET-32a(+):GSLINK. Se indica en el recuadro amarillo la metionina inicial, en gris la cola de histidinas, en verde el péptido GSLINK y en rojo el codón paro.

6.1.6 Inducción de proteínas totales solubles.

Las pruebas para la expresión de los péptidos sintéticos GSUNION y GSLINK con IPTG a una concentración 0.1 mM mostraron mayor inducción a las 20 h en las cepas que contenían las construcciones PET-32a (+):GSUNION y PET-32a (+):GSLINK (Figura 11 A). El peso molecular de los péptidos obtenidos fue de aproximadamente 23 kDa para PET-32a(+):GSUNION y de 25 kDa para PET-32a(+):GSLINK (Figura 11 B), coincidiendo con

el tamaño de proteína esperado de 23.81 y 25.72 kDa respectivamente predicho *in silico* considerando la predicción de la proteína que incluye a partir del codón de inicio, las colas de histidinas, el péptido sintético, el sitio enteroquinasa y el codón paro, resaltado en las figuras 9 y 10.

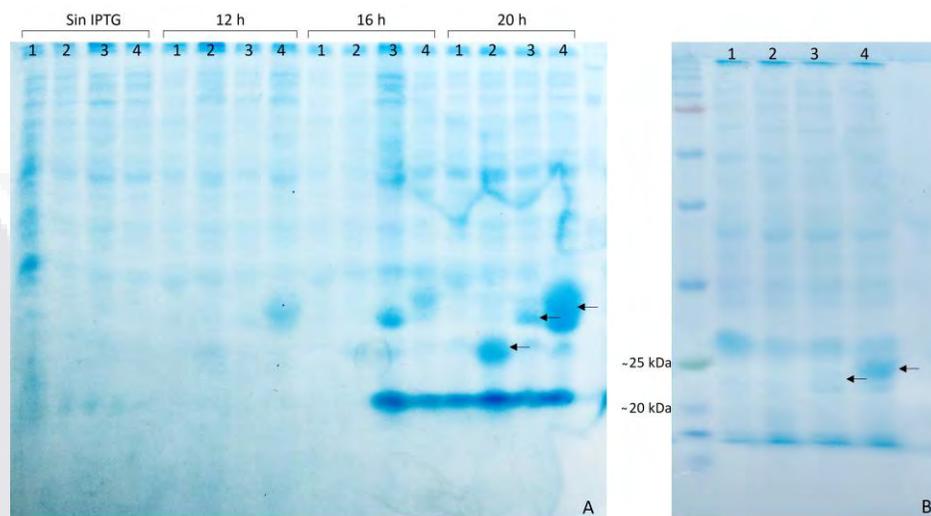


Figura 11. Expresión de los péptidos sintéticos GSUNION y GSLINK. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie de PST de *E. coli* BL21 Rosetta. 1) sin vector, 2) con vector pET-32a (+), 3) PET-32a(+):GSUNION y 4) PET-32a(+):GSLINK. A) Pruebas de inducción con IPTG 0.1 mM a 12, 16 y 20 h; B) inducción IPTG 0.1 mM a 20 h. MPM Bluelif Prestained Protein Marker.

6.1.7 Pruebas de capacidad antimicrobiana de GSUNION y GSLINK.

Las pruebas realizadas mostraron inhibición de *S. aureus* (ATCC 29213) tras 60 min de tratamiento con el extracto proteico que contenía el péptido GSLINK a 50 µg/ml (Figura 12), a diferencia del resto de los tratamientos incluido el extracto proteico que contenía el péptido GSUNION que no produjo cambios significativos en las UFC a lo largo del tiempo de exposición (Tabla 3). Los extractos proteicos que contenían los péptidos GSUNION y GSLINK a 50 µg/ml mostraron inhibición de *E. coli* (ATCC 25922), a los 60 min de exposición y de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) a los 80 min de exposición (Figura 12, Tabla 3), sin embargo, durante dichos tiempos el resto de los tratamientos control también mostraron el mismo nivel de inhibición de las UFC, por lo cual se atribuye a un efecto en el crecimiento de los cultivos y no a los tratamientos aplicados.

La concentración de ampicilina utilizada de 1000 mg/ml no inhibió los cultivos bacterianos probados sino hasta las 8 h de exposición (resultados no mostrados).

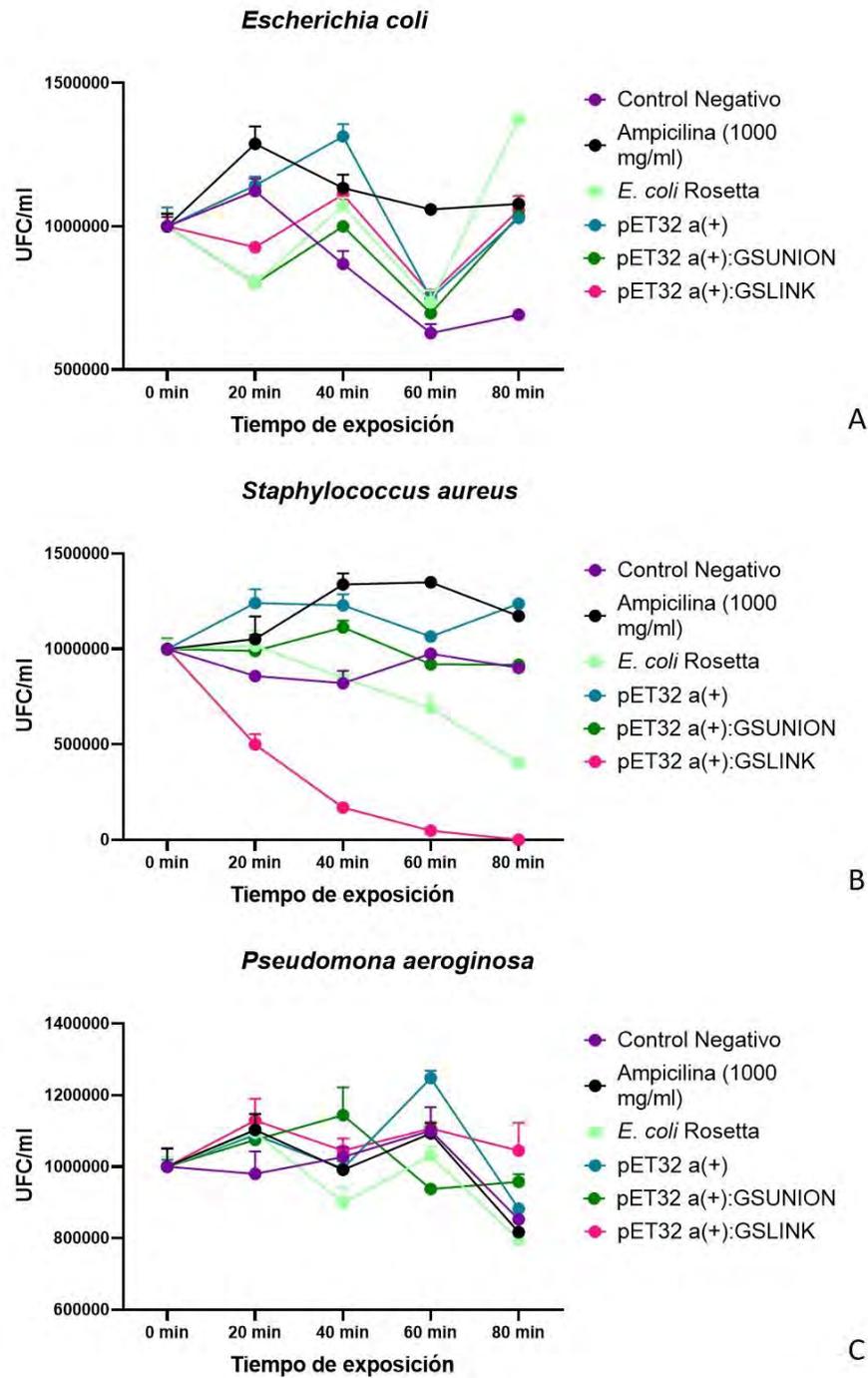


Figura 12. Pruebas de inhibición bacteriana con extractos de proteínas totales solubles a diferentes tiempos de exposición. A) *Escherichia coli* (ATCC 25922), B) *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y C) *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853).

Tabla 3. Pruebas de inhibición bacteriana con extractos de proteínas totales solubles a diferentes tiempos de exposición.

<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)					
	0 min	20 min	40 min	60 min	80 min
Control negativo	1000000 ± 55555.6 def	1123148.1 ± 75205.5 bcd	868518.5 ± 79500.3 fgh	627777.8 ± 54558.9 i	691666.7 ± 25000 hi
Ampicilina (1000 mg/ml)	1000000 ± 74468.1 def	1287943.3 ± 105105.8 abc	1133687.9 ± 79867.6 bcd	1059219.8 ± 28867.5 def	1078191.5 ± 25000 de
Extracto proteico de <i>E. coli</i> BL21 Rosetta (50 µg/ml)	1000000 ± 110497.2 def	801197.0 ± 175827.2 ghi	1071915.3 ± 193039.4 de	734898.7 ± 289241.9 ghi	1373066.3 ± 100000 a
Extracto proteico con pET32 a(+) (50 µg/ml)	1000000 ± 112970.7 def	1142189.7 ± 54329 abc	1313737.8 ± 72904.4 ab	748884.2 ± 29169.2 ghi	1029184.1 ± 25000 def
Extracto proteico con pET32 a(+):GSUNION (50 µg/ml)	1000000 ± 78838.2 def	800899.0 ± 31437.1 ghi	1000069.1 ± 29164.2 def	697164.6 ± 72394.5 hi	1037344.4 ± 8298.7 def
Extracto proteico con pET32 a(+):GSLINK (50 µg/ml)	1000000 ± 75471.7 def	927044.0 ± 29250.3 efg	1111006.3 ± 55302.1 cde	761949.7 ± 34486.7 ghi	1056603.8 ± 84905.7 def
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)					
	0 min	20 min	40 min	60 min	80 min
Control negativo	1000000 ± 51162.8 bcdef	858527.1 ± 37069.7 efg	821317.8 ± 110803.2 fg	974806.2 ± 30329.3 cdef	901162.8 ± 17441.9 efg
Ampicilina 1000 mg/ml	1000000 ± 11904.8 bcdef	1052380.9 ± 204429.4 bcdef	1338095.2 ± 99516.9 a	1350000 ± 31225.9 a	1172619.0 ± 32738.1 abcd
Extracto proteico de <i>E. coli</i> BL21 Rosetta (50 µg/ml)	1000000 ± 336842.1 bcdef	1016666.7 ± 559415.3 bcdef	848245.6 ± 204203.3 fg	690350.9 ± 436598.9 gh	403947.4 ± 100000
Extracto proteico con pET32 a(+) (50 µg/ml)	1000000 ± 54545.4 bcdef	1240909.1 ± 124602.2 ab	1228787.9 ± 101175.4 abc	1065151.5 ± 34116.1 bcdef	1237121.2 ± 25000 ab
Extracto proteico con pET32 a(+):GSUNION (50 µg/ml)	1000000 ± 96774.2 bcdef	989784.9 ± 148003 bcde	1113440.9 ± 61023.3 abcde	919892.5 ± 30805.1 defg	917473.1 ± 25000 defg
Extracto proteico con pET32 a(+):GSLINK (50 µg/ml)	1000000 ± 34482.7 bcdef	499425.3 ± 94188 hi	168390.8 ± 29679.9 jk	47701.1 ± 29072.7 k	0 ± 0 k
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)					
	0 min	20 min	40 min	60 min	80 min
Control negativo	1000000 ± 26178 bcdefg	980017.4 ± 108618 bcdefg	1027137.9 ± 46652.9 bcdef	1100436.3 ± 113674.2 abc	852225.1 ± 25000 efg
Ampicilina 1000 mg/ml	1000000 ± 86294.4bcdefg	1102961.1 ± 76705.3 abc	991285.9 ± 58395.7 bcdefg	1092808.8 ± 49824 abcd	816878.2 ± 25000 efg
Extracto proteico de <i>E. coli</i> BL21 Rosetta (50 µg/ml)	1000000 ± 45751.6 bcdefg	1095098.0 ± 29598.2 abc	899019.6 ± 77474.4 cdefg	1029738.6 ± 43603.9 bcde	796241.8 ± 25000 g
Extracto proteico con pET32 a(+) (50 µg/ml)	1000000 ± 32967 bcdefg	1088095.2 ± 33242.1 abcd	994688.6 ± 36281.8 bcdefg	1247435.9 ± 36281.8 a	882142.9 ± 25000 defg
Extracto proteico con pET32 a(+):GSUNION (50 µg/ml)	1000000 ± 26455 bcdefg	1074867.7 ± 60272.8 abcd	1143650.8 ± 135388.5 ab	937301.6 ± 28867.5 bcdefg	957671.9 ± 37037 bcdefg
Extracto proteico con pET32 a(+):GSLINK (50 µg/ml)	1000000 ± 89887.6 bcdefg	1129026.2 ± 105163.3 ab	1044756.5 ± 58222.2 abcde	1106554.3 ± 30977.1 abc	1044943.8 ± 134831.abcde

Se presenta la media ± la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el método de Tuckey ($\alpha=0.05$).

6.2 Obtención de material vegetal por propagación de *M. bombycina* y *H. undatus* *in vitro*.

Tras 35 días de cultivo se comenzó a apreciar respuesta por parte de los explantes de *M. bombycina* y *H. undatus*. Para el caso de *M. bombycina*, se observó vitrificación de algunas zonas del tejido o producción de callo, producción de raíces adventicias y

surgimiento de algunos brotes, mientras que para el caso de *H. undatus* se tiene el surgimiento de raíces principales y aéreas, y brotes nuevos (Figura 13).



Figura 13. Propagación de cactáceas *in vitro*. **1A)** Planta madre *M. bombycina in vitro*. **1B)** Explantes de *M. bombycina* tras un periodo de incubación de 35 días a 25 °C bajo un fotoperiodo 16:8 h luz/oscuridad. **2A)** Planta madre *H. undatus in vitro*. **2B)** Explantes de *H. undatus* tras un periodo de incubación de 35 días a 25 °C bajo un fotoperiodo 16:8 h luz/oscuridad.

6.3 Síntesis verde de *BvAgNP*.

La mezcla de reacción para la síntesis de *BvAgNP* a partir de AgNO_3 1 mM y extracto de acelga, mostró un cambio de coloración a los 15 días de incubación, además, el análisis de absorbancia reveló la presencia de un pico característico del plasmón de resonancia de superficie de las *BvAgNP* a 420 nm en la curva resultante del barrido de 300 y 600 nm (Figura 14), comprobando la síntesis de *BvAgNP*.

El producto obtenido tuvo un rendimiento promedio de 36.2587 mg de *BvAgNP* por litro de reacción preparada.

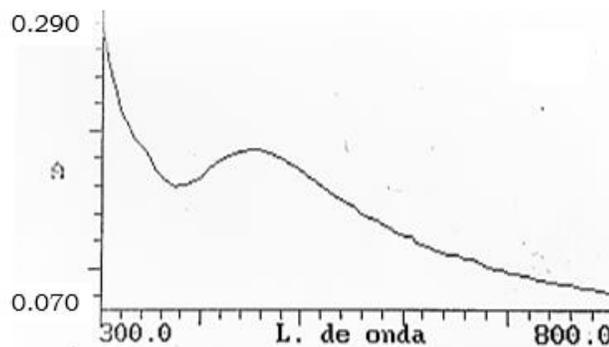


Figura 14. Análisis de absorción con barrido de 300-800nm en espectrofotómetro UV visible de BvAgNP.

6.4 Identificación de contaminantes de *M. bombycina in vitro*.

6.4.1 Selección de microorganismos

Los tres microorganismos contaminantes de cactáceas *in vitro* fueron seleccionados por su alta prevalencia en los cultivos. Los tres aislados se muestran en la figura 15 y fueron denominados como contaminante “A”, “B” y “C”.

6.4.2 Análisis morfológicos de microorganismos contaminantes de *M. bombycina in vitro*.

El contaminante A corresponde a un actinomyces de color negro y consistencia rígida, presenta células en cadena parecidas a esporas fúngicas sin presencia de cuerpos fructíferos (Figura 15 A1, Tabla 4). El contaminante B forma una biopelícula sobre el medio de cultivo de color naranja, microscópicamente son bacilos irregulares o de apariencia difusa y cocos Gram positivos, y las colonias maduras muestran gran cantidad de esporas según la tinción de Schaeffer-Fulton (Figura 15 B1, Tabla 4) además es positivo a la tinción Ziehl- Neelsen indicadora de *Mycobacterium*. El contaminante C forma colonias circulares, de borde completo, lisas de textura suave y color rosa brillante, microscópicamente son bacilos o streptobacilos gram negativos vacuolados no esporulados (Figura 15 C1, Tabla 4). De manera adicional y solo al contaminante C se realizó un análisis automatizado de identificación microbiana con el equipo Vitek 2, dando como resultado un 98% identidad con *Methylobacterium* sp. No fue posible realizar dicho análisis a los contaminantes A y B por su lento crecimiento.

Tabla 4. Características morfológicas de contaminantes de cactáceas *in vitro*.

	Contaminante A	Contaminante B	Contaminante C
Medio	Cultivo vegetal en MS	PDA	PDA
Tinción simple azul de lactofenol	Células esféricas en cadena, semejantes a hifas.	-	-
Tinción Gram	-	Bacilos irregulares y cocos. Gram +	Bacilos. Gram -
Tinción Schaeffer-Fulton	-	Abundantes esporas en colonias maduras.	Bacilos vacuolados no esporulados
Tinción Ziehl-Neelsen	-	Positivo	Negativo

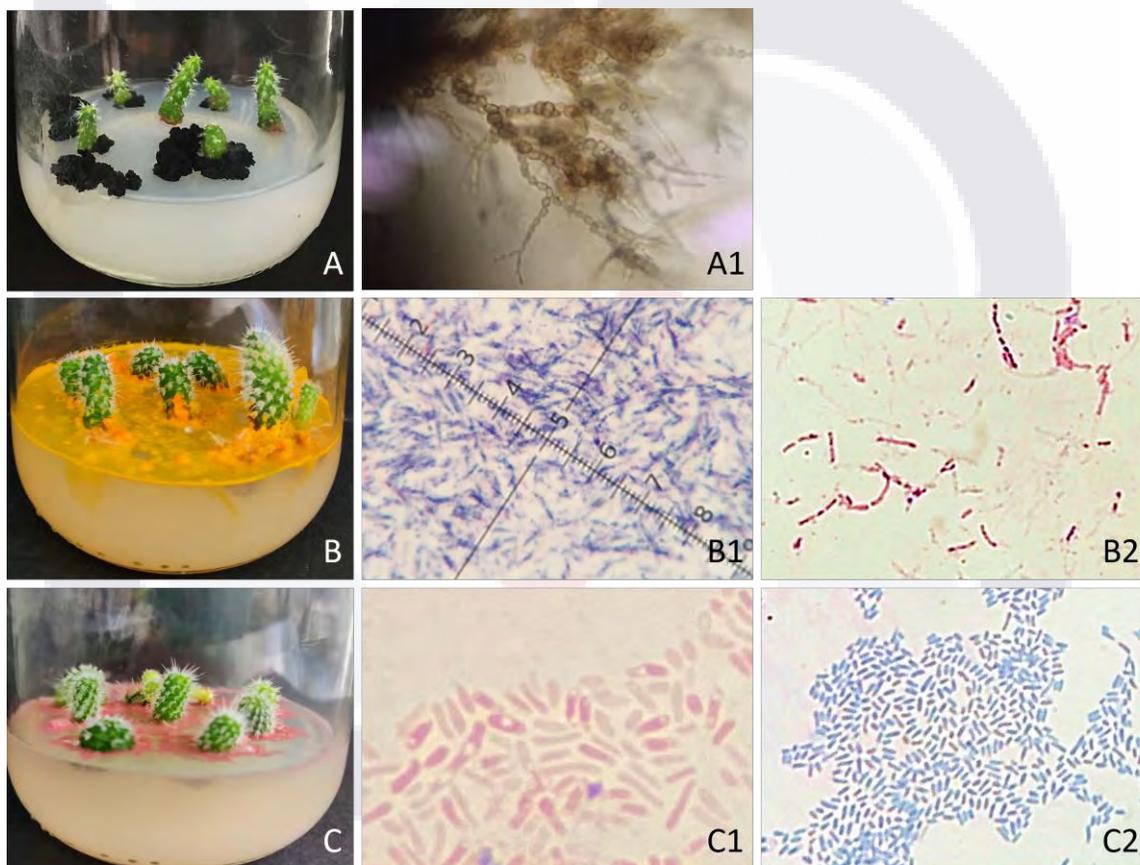


Figura 15. Características morfológicas de contaminantes de cactáceas *in vitro*. A) *Spissiomycetes* sp.; A1) Tinción simple de *Spissiomycetes* sp.; B) *Mycobacterium* sp.; B1) Tinción Gram + de *Mycobacterium* sp.; B2) Tinción Ziehl-Neelsen positiva de *Mycobacterium* sp.; C) *Methylobacterium* sp.; C1) Tinción Gram - de *Methylobacterium* sp.; B2) Tinción Ziehl-Neelsen negativa de *Methylobacterium*.

6.4.3 Identificación de microorganismos contaminantes de *M. bombycina* in vitro por secuenciación de 16s.

Para el contaminante A se obtuvo un fragmento secuenciado de 547 pb que corresponde a la región 18S rRNA – ITS 1- 5.8S rRNA- ITS 2 -28S rRNA (Tabla 5) en la búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos NCBI [(BLASTX) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>] (Marchler-Bauer, 2015), mostró mayor porcentaje de identidad con secuencias como *Spissiomycetes* sp. (MF990800.1) con el 88.87 %, *Spissiomycetes* sp. (KF513515.1) con el 88.79 % y *Dothideomycetes* sp. (MW361320.1). con el 87.88 %.

El contaminante B mediante la región 16S rRNA tuvo mayor porcentaje de identidad (mayor a 98%) con diferentes secuencias correspondientes a *Mycobacterium*, por ejemplo, de 98.89% con *Mycobacterium gordonae* (MK583505.1).

Y finalmente el contaminante C con la región región 16S rRNA mostró mayor porcentaje de identidad con diferentes secuencias pertenecientes a *Methylobacterium*, por ejemplo, de 97.85% con *Methylobacterium phyllosphaerae* (MN629083.1) y de 97.85 *Methylobacterium fujisawaense* (MN629052.1).

Tabla 5. Análisis *in silico* de contaminantes de cactáceas *in vitro*.

	Contaminante A	Contaminante B	Contaminante C
PCR	A partir de ADN	De colonia	De colonia
Región secuenciada	18 ^a rRNA – ITS 1- 5.8S rRNA- ITS 2 -28S rRNA Fragmento: 547 pb	16S rRNA Fragmento: 742 pb	16S rRNA Fragmento: 722 pb
Especie identificada	<i>Spissiomycetes</i> sp.	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>Methylobacterium</i> sp.

Los dendrogramas construidos con las secuencias de mayor porcentaje de identidad reportadas en la base de datos de NCB (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Marchler-Bauer, 2015) respecto a cada una de las regiones secuenciadas de los contaminantes analizados, mostraron la formación de grupos diferenciados donde se agruparon las regiones analizadas. El contaminante A muestra relación con Familia de los *Dothydeomycetes*, y en particular el género *Spissiomycetes* sp. (Figura 16). El contaminante B mostró relación con la familia *Mycobacteriaceae*, especialmente del género es *Mycobacterium* (Figura 17).

Finalmente, el contaminante C mostró relación con la familia *Methylobacteriaceae* y el género *Methylobacterium* (Figura 18), sin embargo, no fue posible identificar la especie debido a que no se encuentran reportadas las secuencias para todas las especies de este género dentro de la base de datos utilizada.

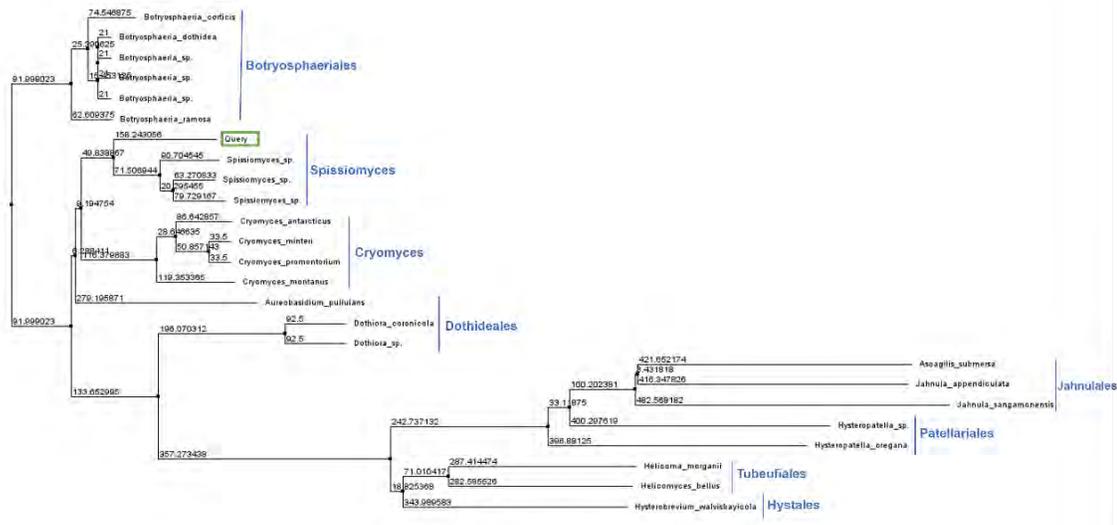


Figura 16. Dendrograma de identidad de Contaminante A por la región ITS. Se incluyen algunos géneros de *Dothideomycetes*. La región secuenciada del contaminante A se describe como Query marcada en verde. Los números indican la longitud de cada una de las ramas. El análisis fue realizado con el Software Jalview (Waterhouse *et. al.*, 2009) por el método de unir vecinos y usando el algoritmo de alineamiento MUSCLE.

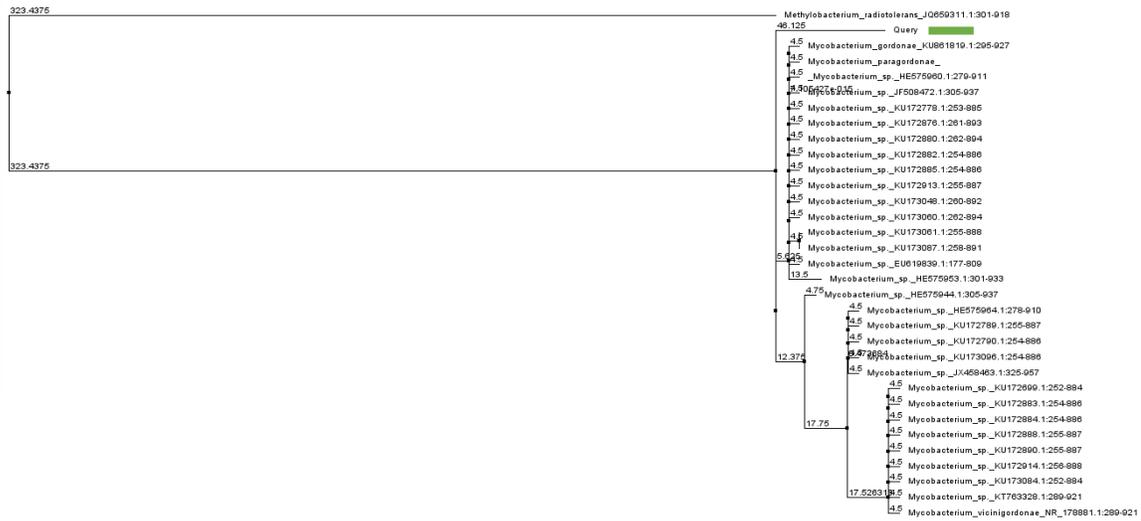


Figura 17. Dendrograma de identidad de Contaminante B por región 16S rRNA. Se incluyen representantes de la familia *Mycobacteriaceae*. La región secuenciada del contaminante B se describe como Query marcada en verde. Los números indican la longitud de cada una de las ramas. Y pertenece a *Mycobacterium* sp. El análisis fue realizado con el Software Jalview (Waterhouse *et. al.*, 2009) por el método de unir vecinos y usando el algoritmo de alineamiento MUSCLE.

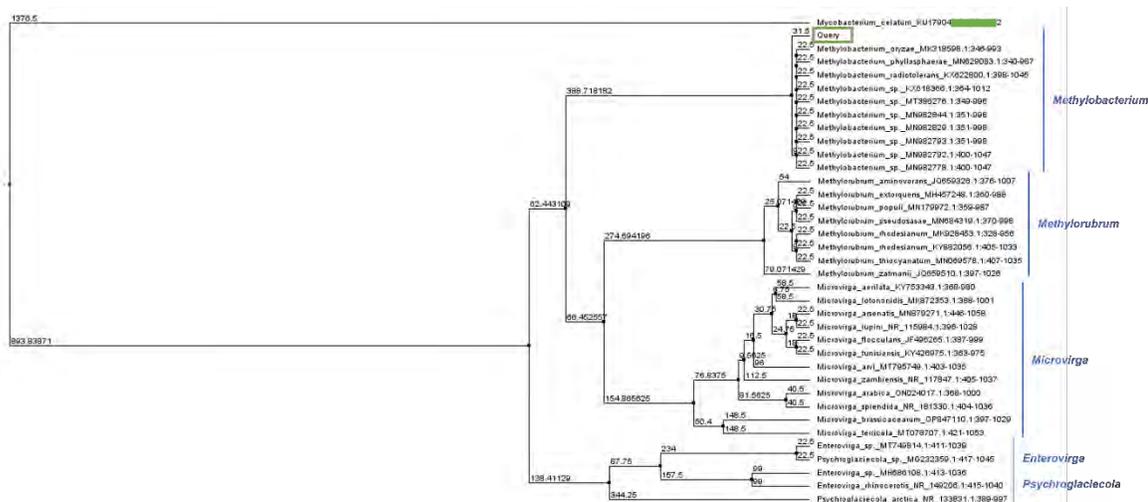


Figura 18. Dendrograma de identidad de Contaminante C por región 16S rRNA. Se incluyen los géneros de la familia *Methylobacteriaceae*. La región secuenciada del contaminante C se describe como Query marcada en verde y pertenece a *Methylobacterium* sp. Los números indican la longitud de cada una de las ramas. El análisis fue realizado con el Software Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009) por el método de unir vecinos y usando el algoritmo de alineamiento MUSCLE.

Después de todo el análisis descrito, los aislados de *M. bombycina* fueron nombrados como *Spissiomycetes bomby*, *Mycobacterium bomby* y *Methylobacterium bomby* correspondientes al contaminante A, B y C respectivamente.

6.4.4 Huella génica de *Mycobacterium bomby* y *Methylobacterium bomby* por REP-PCR.

Las PCR con oligonucleótidos BOX, ERIC y REP de *Methylobacterium bomby* y *Mycobacterium bomby* revelaron bandeos característicos de los aislados expuestos en la figura 19 como parte de su huella génica. *Methylobacterium bomby* y *Mycobacterium bomby* tuvieron entre sí un 23.53, 17.39 y 35.29 % de bandas monomórficas y un 76.47, 82.61, 64.71 % de bandas polimórficas con los oligonucleótidos BOX, ERIC y REP respectivamente (Tabla 6).

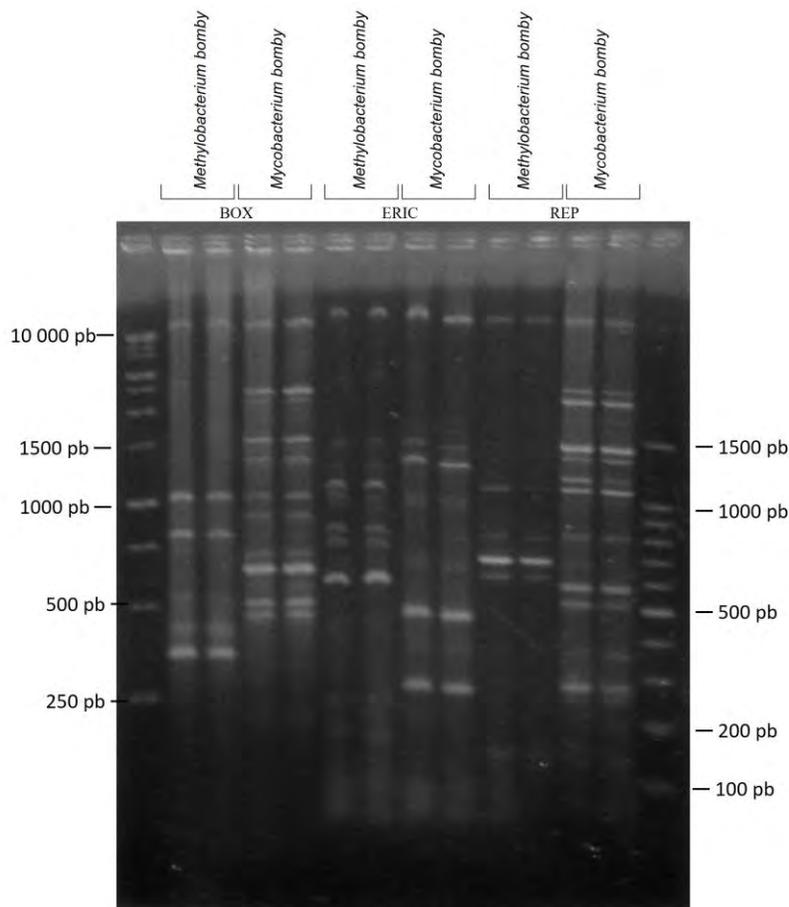


Figura 19. Huella génica por REP-PCR de bacterias aisladas de *M. bombycina in vitro*. Electroforesis en gel de agarosa 2% con oligonucleótidos BOX, ERIC y REP de bacterias *Methylobacterium bomby* y *Mycobacterium bomby*. Los análisis se muestran por duplicado. MPM 1 kb Plus DNA Ladder y 100 pb Promega.

Tabla 6. Bandeos obtenidos por REP-PCR específicos de *Methylobacterium bomby* y *Mycobacterium bomby*.

Oligos	BOX		ERIC		REP	
	Methylobacterium	Mycobacterium	Methylobacterium	Mycobacterium	Methylobacterium	Mycobacterium
Bacteria	>10 000	>10 000	>10 000	>10 000	>10 000	>10 000
	1050	2400	1550	1450	1100	2400
	800	2200	1200	1300	800	2200
	550	1550	1100	1000	700	1450
	410	1300	1000	960	640	1350
Bandas (pb)	375	1060	900	710	150	1150
		900	800	660	570	1050
		680	750	650	510	810
		625	600	480	280	
		510	260	290		
		480	200	100		
			100			
% Bandas monomórfica	23.53		17.39		35.29	
% Bandas polimórficas	76.47		82.61		64.71	

6.5 Evaluación de la capacidad antimicrobiana de BvAgNP.

6.5.1 Pruebas de inhibición de cepas de hongos conocidos con BvAgNP.

Según el porcentaje de inhibición radial, los tratamientos con 100 mg/L, 50 mg/L y 25 mg/L de BvAgNP, no ejercen inhibición significativa en *Aspergillus sp.*, *Colletotrichum sp.* o *Cladosporium sp.* tras 30 min y 1 h de exposición (Figura 20). El análisis factorial 3² mostró que los cambios de concentración no influyen en el %IR en ninguno de los hongos probados con un nivel de confianza del 95%. Sin embargo, tras 3 h de exposición, todas las concentraciones de BvAgNP probadas tienen un 100% de inhibición contra *Aspergillus* y *Colletotrichum sp.*, y un promedio de 12.29% contra *Cladosporium sp.* (Figura 21).

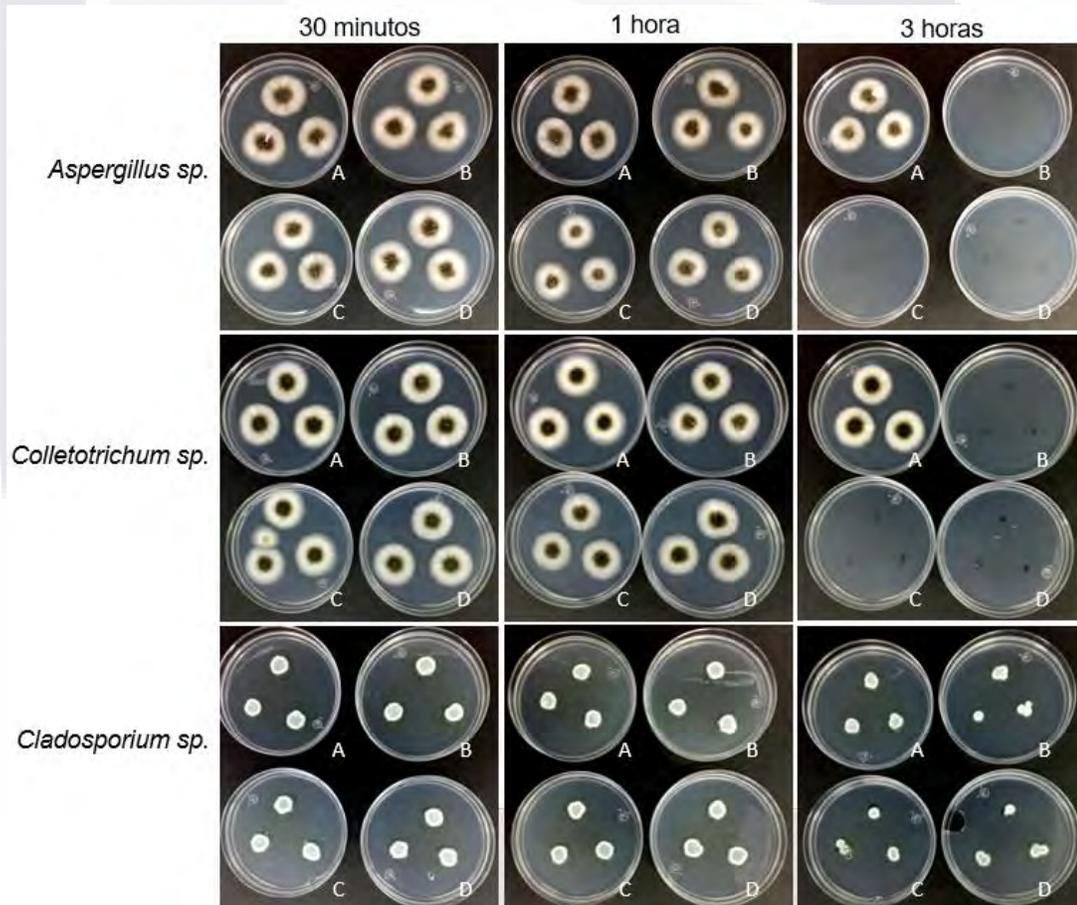


Figura 20. Pruebas de inhibición de hongos con BvAgNP. A) Control sin BvAgNP. B) 100 mg/L BvAgNP. C) 50 mg/L BvAgNP. D) 25 mg/L BvAgNP.

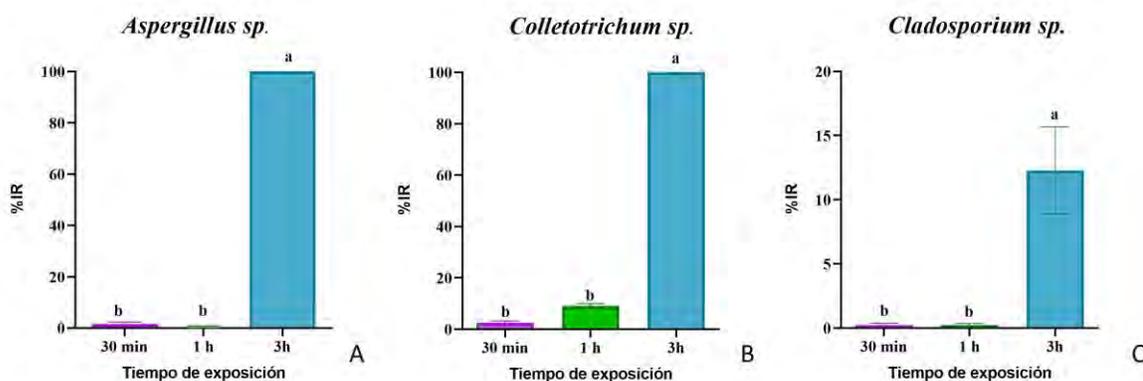


Figura 21. Análisis de inhibición fúngica de BvAgNP a diferentes tiempos de exposición. Se observan diferencias significativas en el %IR de A) *Aspergillus sp.*, B) *Colletotrichum sp.* y C) *Cladosporium sp.* tras exposición de 3 h con BvAgNP, según la prueba de comparación de medias con el método de Tuckey ($\alpha=0.05$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras.

6.5.2 Efecto inhibitorio de BvAgNP contra *Spissiomycetes bomby*, *Mycobacterium bomby* y *Methylobacterium bomby*.

6.5.2.1 *Spissiomycetes bomby* con BvAgNP.

Las prueba de inhibición de *Spissiomycetes bomby* mostró aumento del porcentaje de inhibición radial a partir de 10 min con 100 mg/L de BvAgNP, y a partir de los 15 min con 25 y 50 mg/L de BvAgNP (Figura 22, Tabla 7). Curiosamente, durante los primeros 5 – 10 minutos, se observó un mayor crecimiento en las colonias tratadas con BvAgNP comparadas con el control sin BvAgNP, efecto provocado posiblemente por la capacidad nutritiva del recubrimiento orgánico de las BvAgNP.

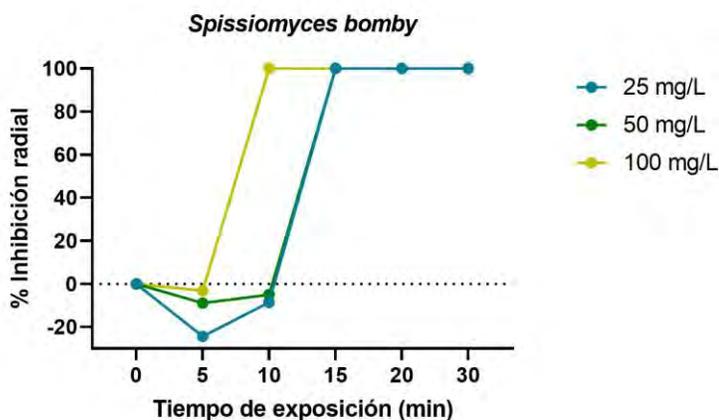


Figura 22. Pruebas de inhibición de Spissiomycetes bomby con BvAgNP a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

Tabla 7. Pruebas de inhibición radial de *Spissiomycetes bomby* con BvAgNP a diferentes concentraciones.

Tiempos	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
25 mg/L						
BvAgNP	0 ± 12.8 b	-24.4 ± 9.6 c	-8.6 ± 12.0 bc	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
50 mg/L						
BvAgNP	0 ± 12.4 b	-8.9 ± 2.0 bc	-5.0 ± 6.0 bc	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
100 mg/L						
BvAgNP	0 ± 2.5 b	-3.2 ± 10.6 b	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a

Se presenta la media ± la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el método de Tuckey ($\alpha=0.05$).

6.5.2.2 *Mycobacterium bomby* con BvAgNP.

El antibiograma de *Mycobacterium bomby* mostró resistencia por diversos antibióticos para Gram positivos PT 34 Multibac I.D. (Tabla 8), sin embargo, en literatura se reporta sensibilidad a rifampicina para el género *Mycobacterium*. En la figura 23 puede apreciarse inhibición a 25 y 50 mg/L de BvAgNP a 24 h de exposición comparado con el control. Sin embargo, hay mayor inhibición de UFC con rifampicina 100 mg/L que con BvAgNP (Figura 23, Tabla 9).

Tabla 8. Antibiogramas Gram positivos contra *Mycobacterium bomby*.

Antibiótico		Resistencia	Antibiótico		Resistencia
Ampicilina	10 Mcg	***	Eritromicina	10 Mcg	***
Cefalotina	30 Mcg	***	Gentamicina	10 Mcg	**
Cefotaxima	30 Mcg	***	Penicilina	30 Mcg	***
Ciprofloxacino	5 Mcg	***	Sulfameroxazol/ Trimetoprim	25 Mcg	***
Clindamicina	30 Mcg	***			
Dicloxacilina	1 Mcg	***	Vancomicina	30 Mcg	***

*Poca resistencia

**Moderada resistencia

***Alta resistencia

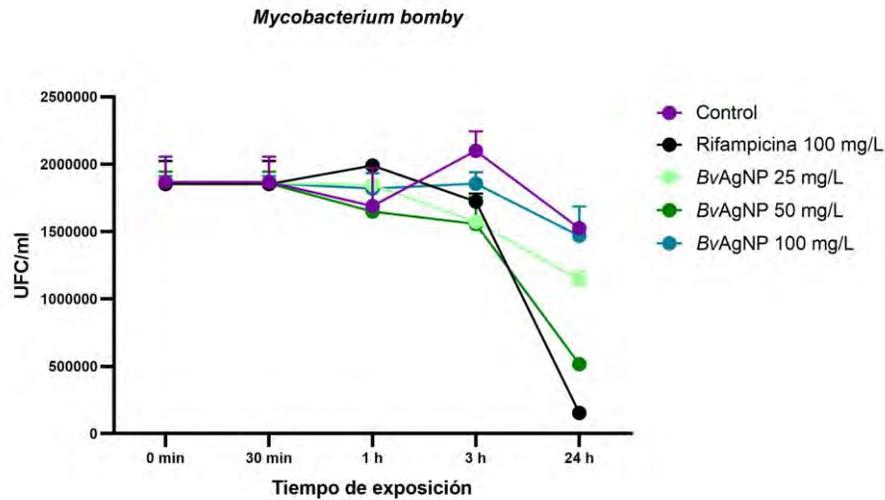


Figura 23. Pruebas de inhibición de *Mycobacterium bomby* con BvAgNP a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

Tabla 9. Pruebas de inhibición de *Mycobacterium bomby* con BvAgNP a diferentes concentraciones.

Tiempos	0 min	30 min	1 h	3 h	24 h
Control	1866667 ± 327159 a	1866667 ± 295691 a	1690000 ± 69462 ab	2100000 ± 151747 a	1525000 ± 90280 ab
Rifampicina 100 mg/L	1853333 ± 327159 ab	1853333 ± 295691 ab	1990000 ± 69462 a	1723333 ± 151747 ab	153333 ± 90280 d
25 mg/L BvAgNP	1860000 ± 492443 a	1860000 ± 10000 a	1847061 ± 280644 ab	1572104 ± 281483 ab	1141878 ± 197856 bc
50 mg/L BvAgNP	1856667 ± 249800 a	1856667 ± 100166 a	1648520 ± 82914 ab	1556936 ± 342576 ab	516203 ± 146995 cd
100 mg/L BvAgNP	1858333 ± 45000 a	1858333 ± 11547 a	1818794 ± 101006 ab	1855509 ± 62859 ab	1468592 ± 376755 ab

Se presenta la media ± la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el método de Tuckey ($\alpha=0.05$).

6.5.2.3 *Methylobacterium bomby* con BvAgNP.

El antibiograma de *Methylobacterium bomby* mostró resistencia por diversos antibióticos para Gram negativos PT 35 Multibac I.D. y menor resistencia hacia amikacina, gentamicina y netilmicina (Tabla 10). En la figura 24 puede apreciarse inhibición a partir de 25 mg/L de BvAgNP a partir de los 5 min de exposición comparado con el control. Hay mayor inhibición de UFC con BvAgNP que con amikacina (Figura 24, Tabla 11).

Tabla 10. Antibiogramas Gram negativos contra *Methylobacterium bomby*.

Antibiótico	Resistencia	Antibiótico	Resistencia
Amikacina 30 Mcg	*	Gentamicina 10 Mcg	**
Ampicilina 10 Mcg	***	Netilmicina 30 Mcg	**
Carbencilina 100 Mcg	***	Nitrofurantoína 300 Mcg	***
Cefalotina 30 Mcg	***	Norfloxacino 25 Mcg	***
Cefataxima 30 Mcg	***	Sulfametaxazol/ Trimetropim	***
Ciprofloxacino 5 Mcg	***	Cloranfenicol 30 Mcg	***

*Poca resistencia

**Moderada resistencia

***Alta resistencia

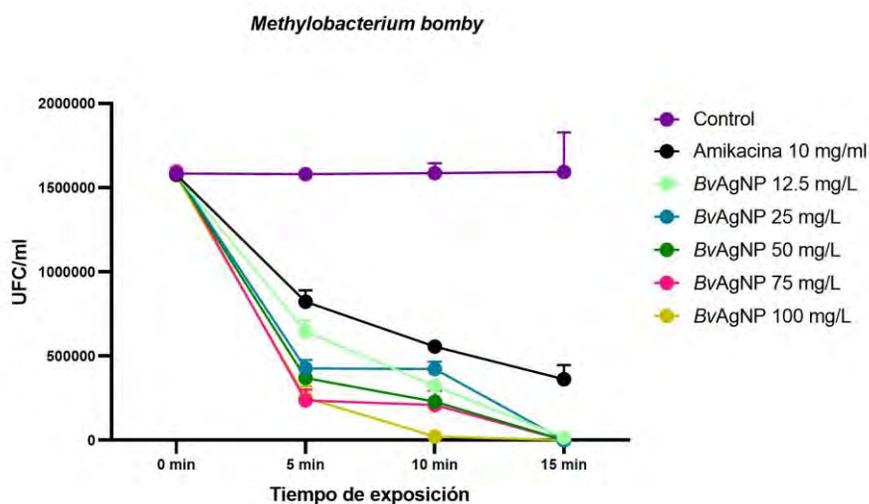


Figura 24. Pruebas de inhibición de *Methylobacterium bomby* con BvAgNP a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

Tabla 11. Pruebas de inhibición de *Methylobacterium bomby* en *M. bombycina* con BvAgNP a diferentes concentraciones.

Tratamientos	0 min	5 min	10 min	15 min
Control	1583333 ± 15275 a	1583333 ± 15275 a	1580000 ± 10000 a	1586666 ± 100664 a
Amikacina 10 mg/ml	1576666 ± 23094 a	1576666 ± 23094 a	822916 ± 115724 bc	556666 ± 70238 cde
12.5 mg/L BvAgNP	1576666 ± 55076 a	1576666 ± 55076 a	646666 ± 109697 cd	323046 ± 24711 cde
25 mg/L BvAgNP	1586666 ± 5774 a	1586666 ± 5774 a	426666 ± 86217 cde	423333 ± 75056 cde
50 mg/L BvAgNP	1580000 ± 10000 a	1580000 ± 10000 ab	370000 ± 17321 cde	230000 ± 62450 cde
75 mg/L BvAgNP	15966666 ± 25166 a	15966666 ± 25166 a	236666 ± 110604 cde	209207 ± 145937 de
100 mg/L BvAgNP	1573333 ± 20817 a	1573333 ± 20817 a	253333 ± 117189 cde	23333 ± 15275 e

Se presenta la media ± la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el método de Tuckey ($\alpha=0.05$).

6.5.3 Pruebas de desinfección con *BvAgNP* de tejidos inoculados con *Mycobacterium bomby* y *Methylobacterium bomby*.

6.5.3.1 *Mycobacterium bomby*.

Los resultados muestran un aumento de las UFC/gr en los tratamientos con 50 y 100 mg/L de *BvAgNP* respecto al control (Figura 25). El mejor tratamiento de desinfección contra *Mycobacterium bomby* fue en el cual se realizó un lavado con hipoclorito de sodio al 0.5% y se cultivaron los explantes en medio MS basal, sin embargo, el cambio no es significativo. El agua de enjuague mostró la misma tendencia en el aumento de UFC con relación al aumento de concentración de *BvAgNP*. Los tratamientos con *BvAgNP* no tuvieron efecto de inhibición bacteriana (Figura 25).

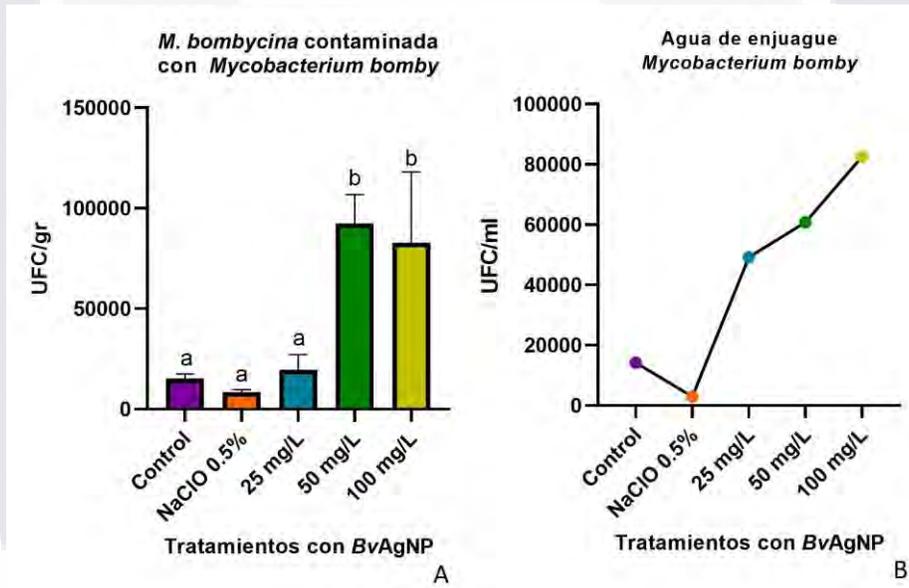


Figura 25. Pruebas de inhibición de *Mycobacterium bomby* en *M. bombycina* cultivada en MS con *BvAgNP* a diferentes concentraciones. Se muestran A) las UFC/gr encontradas en macerados de tejido vegetal y B) las UFC/ml encontradas en agua de enjuague. Se grafica la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el método de Tuckey ($\alpha=0.05$).

6.5.3.2 *Methylobacterium bomby*.

Los resultados muestran una disminución de las UFC/gr en los macerados de *M. bombycina in vitro* previamente inoculada con *Methylobacterium bomby* y tratados con 25 mg/L de *BvAgNP*. Sin embargo, esta disminución no es significativa respecto al

control. El mejor tratamiento de desinfección contra *Methylobacterium bomby* fue en el cual se dio un lavado con hipoclorito de sodio al 0.5% se cultivaron los explantes en medio MS basal. Los tratamientos con *BvAgNP* no tuvieron efecto de inhibición bacteriana, incluso a los 100 mg/L la contaminación aumentó (Figura 26).

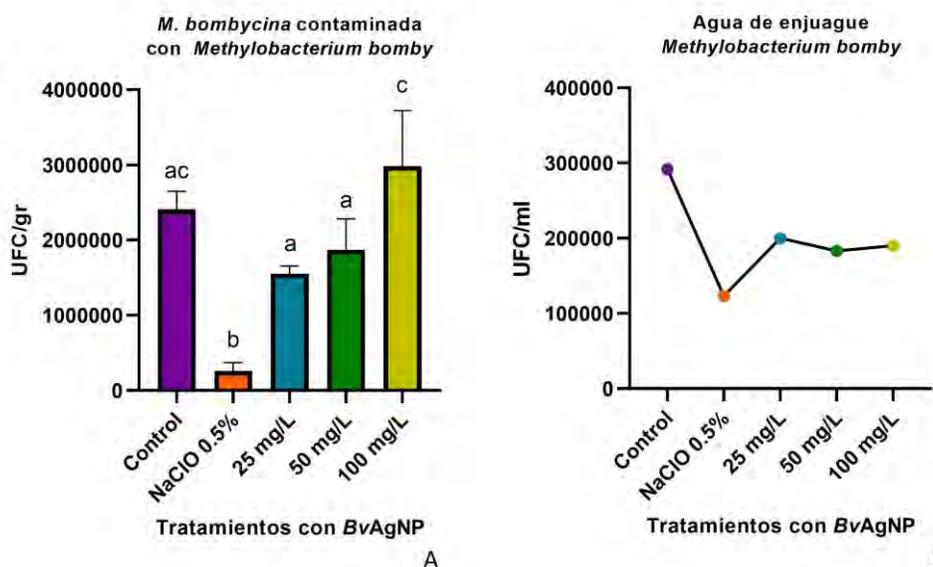


Figura 26. Pruebas de inhibición de *Methylobacterium bomby* en *M. bombycina* cultivada en MS con *BvAgNP* a diferentes concentraciones. Se muestran A) las UFC/gr encontradas en macerados de tejido vegetal y B) las UFC/ml encontradas en agua de enjuague. Se presenta la media \pm la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el método de Tuckey ($\alpha=0.05$).

6.5.4 Pruebas de adaptación en suelo de *M. bombycina in vitro* inoculada con *Methylobacterium bomby*.

La técnica de adaptación en suelo de *M. bombycina* mantuvo una supervivencia del 90% de los explantes. Los explantes tratados con *Methylobacterium bomby* mostraron engrosamiento de tallo de 1.44 ± 0.16 cm, mayor que el engrosamiento de los tallos control sin *Methylobacterium bomby*, de 1.19 ± 0.05 cm tras un periodo de crecimiento de 180 días (Tabla 12). Los explantes tratados con *Methylobacterium bomby* también tuvieron mayor cambio de longitud de tallo y longitud de raíz respecto al control, sin embargo, estos cambios no fueron significativos (Figura 27, Tabla 12).

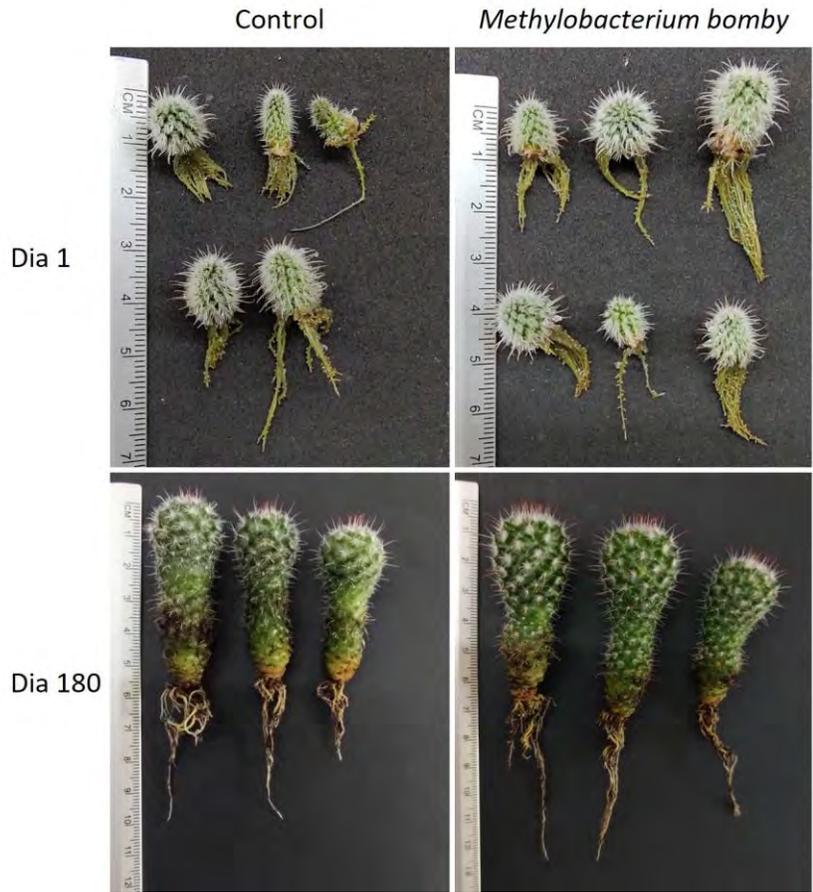


Figura 27. Pruebas de adaptación a suelo de *M. bombycina* inoculada con *Methylobacterium bomby*.

Tabla 12. Características morfológicas de *M. bombycina* inoculada con *Methylobacterium bomby*.

<i>M. bombycina</i>	<i>Methylobacterium bomby</i>	
	Control	<i>Methylobacterium bomby</i>
Cambio de longitud de tallo (cm)	3.33 ± 0.71 a	3.99 ± 0.59 a
Cambio de diámetro de tallo (cm)	1.19 ± 0.05 b	1.44 ± 0.16 a
Cambio de longitud de raíz (cm)	1.64 ± 0.96 a	2.21 ± 0.86 a

Se presenta la media ± la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según una prueba T ($\alpha=0.05$).

6.6 Evaluación del efecto de *BvAgNP* en el crecimiento y desarrollo de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro*.

6.6.1 Efecto en el crecimiento y desarrollo de *H. undatus in vitro* con *BvAgNP* a altas concentraciones.

Se evaluaron los cambios presentados en los explantes de *H. undatus* cultivados con 4 diferentes concentraciones de *BvAgNP* tras 90 días de incubación, comparando con el día 0 (Figura 28). Se aprecia elongación promedio de 0.5 cm, en el control y en explantes con 100 mg/L de *BvAgNP*. Se obtuvo mayor cantidad de brotes en el tratamiento de 100 mg/L comparado a los otros tratamientos y al control. Se observó surgimiento y crecimiento de raíces principales en el control y en las concentraciones de 100 y 200 mg/L (Tabla 13). Por otro lado, no se presentó crecimiento de raíces aéreas en los explantes tratados con *BvAgNP*, sin embargo, a la concentración mayor de 1000 mg/L se tuvo el crecimiento de dos raíces aparentemente aéreas, gruesas y de color amarillo (Figura 28 5B). Todos los frascos con *BvAgNP* se aprecia enrojecimiento en la parte baja del explante, el cual también se presenta en el control, pero en menor cantidad.

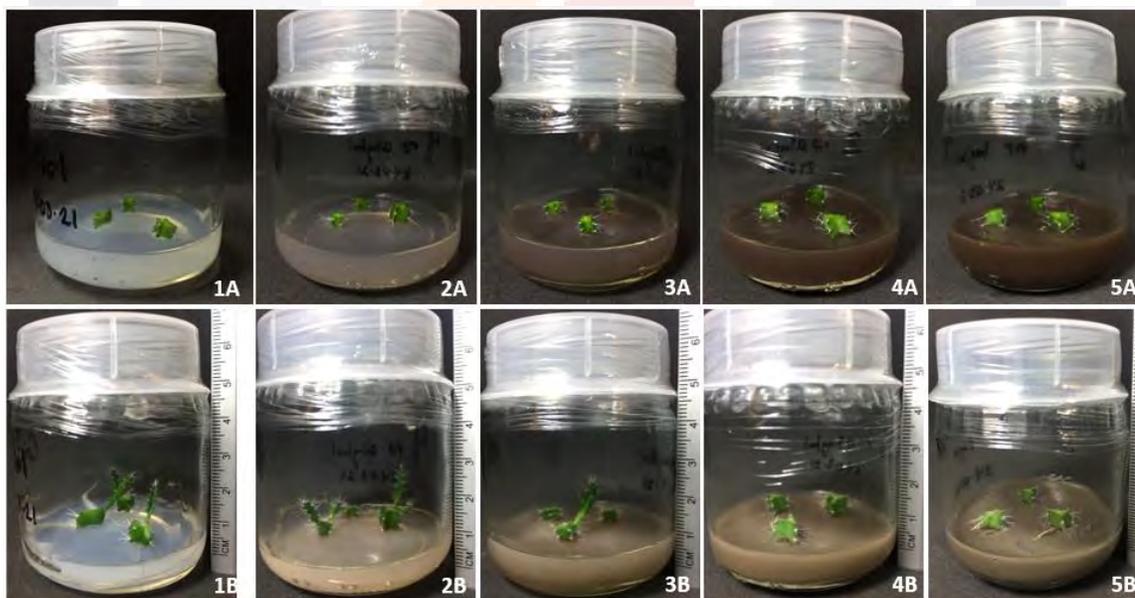


Figura 28. Efecto concentraciones altas de *BvAgNP* en el crecimiento y desarrollo de *H. undatus in vitro*. **1A)** Control, medio MS día 0; **1B)** Control, medio MS día 90; **2A)** *BvAgNP* 100 mg/L día 0; **2B)** *BvAgNP* 100 mg/L día 90; **3A)** *BvAgNP* 200 mg/L día 0; **3B)** *BvAgNP* 200 mg/L día 90; **4A)** *BvAgNP* 500 mg/L día 0; **4B)** *BvAgNP* 500 mg/L día 90; **5A)** *BvAgNP* 1000 mg/L día 0; **5B)** *BvAgNP* 1000 mg/L día 90.

Tabla 13. Efecto de altas concentraciones de *BvAgNP* en el crecimiento y desarrollo de *H. undatus in vitro* a los 90 días de exposición.

<i>H. undatus</i>					
	Control	100 mg/L	200 mg/L	500 mg/L	1000 mg/L
Longitud de explante (cm)	0.5	0.45	0.4	0.5	0.4
Cantidad de brotes (Unidad)	3	5	1	0	0
Cantidad de raíces principales (Unidad)	2	2	2	0	0
Cantidad de raíces aéreas (Unidad)	2	0	0	0	2
Longitud de raíces principales (cm)	10	7	1.5	0	0

6.6.1.1 Análisis por MEB y EDS de *H. undatus in vitro* tratada con *BvAgNP* a altas concentraciones.

Se realizó un análisis MEB a las raíces (Figura 29) y tallos (Figura 30) de los explantes tratados con 1000 mg/L de *BvAgNP* comparando contra los explantes control.

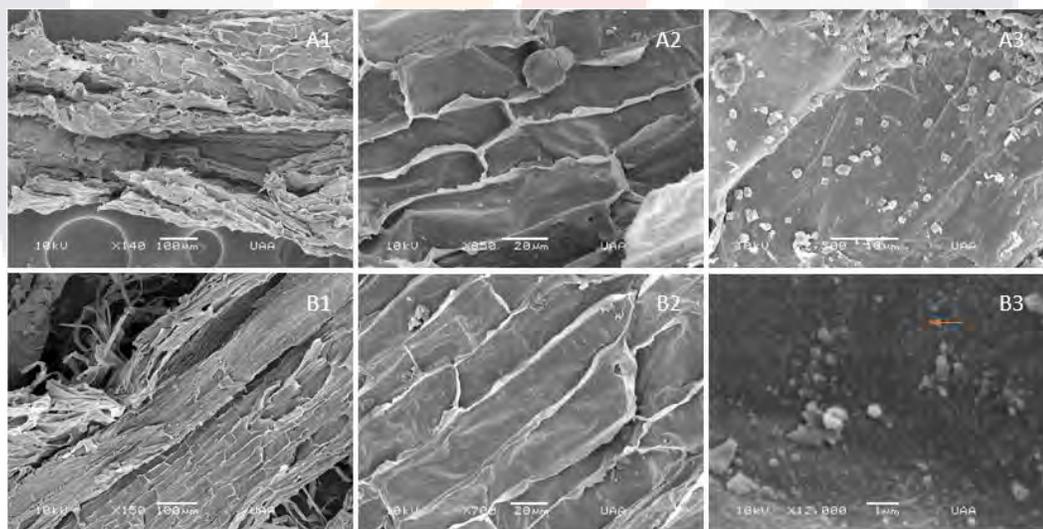


Figura 29. Fotografías por MEB de raíz de *H. undatus*. A1) Parte externa de raíz con un corte longitudinal control sin *BvAgNP*. A2) Células en zona media de raíz control sin *BvAgNP*. A3) Acumulación de sales en control sin *BvAgNP*. B1) Corte longitudinal, parte interna y externa con fibras 1000 mg/L de *BvAgNP*. B2) Células en zona media de raíz 1000 mg/L de *BvAgNP*. B3) Acumulación de sales 1000 mg/L de *BvAgNP*.

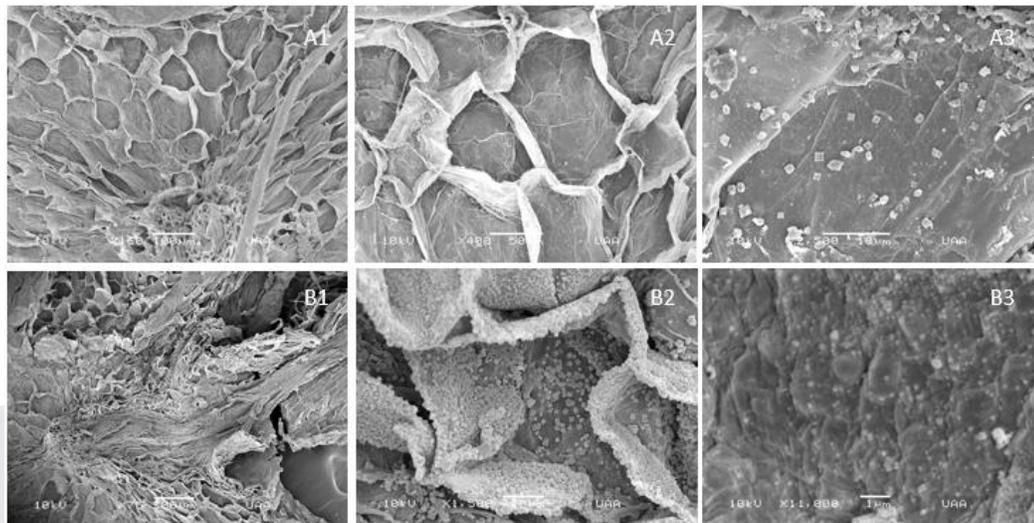


Figura 30. Fotografías por MEB de tallo de *H. undatus*. A1) Zona inferior de explante control sin *BvAgNP*. A2) Células en tallo control sin *BvAgNP*. A3) Acumulación de sales en control sin *BvAgNP*. B1) Zona inferior de explante 1000 mg/L de *BvAgNP*. B2) Células interior del tallo 1000 mg/L de *BvAgNP*. B3) Acumulación de sales en exterior del tallo 1000 mg/L de *BvAgNP*.

El tratamiento con 1000 mg/L de *BvAgNP* causó un daño celular en las células de raíz y tallo de *H. undatus* (Figura 29 y 30; A2 y B2). Además, promovió la formación de fibras en la raíz (Figura 29; B1). Tanto en el control como en los explantes tratados con *BvAgNP* se tiene acumulación de cristales salinos, sin embargo, dicha acumulación es más evidente en la parte externa del tallo de *H. undatus* tratado con 1000 mg/L de *BvAgNP* (Figura 30; B2 y B3).

Se realizó un análisis de elementos por EDS en algunas zonas externas del tallo y en la parte interna de la raíz de los explantes de *H. undatus* tratados con 1000 mg/L de *BvAgNP* comparando con los explantes control, para este análisis se conoce que el medio MS basal no contenía plata. En la superficie externa de tallo control, en la fotografía por MEB se observan partículas redondas que pueden ser vacuolas, en el análisis de elementos por EDS no se detecta plata, en las muestras control de interior de raíz control tampoco se detecta plata. Pero en el exterior de tallo e interior de raíz de explantes con 1000 mg/L de *BvAgNP* si se detecta plata (Figura 31 y 32).

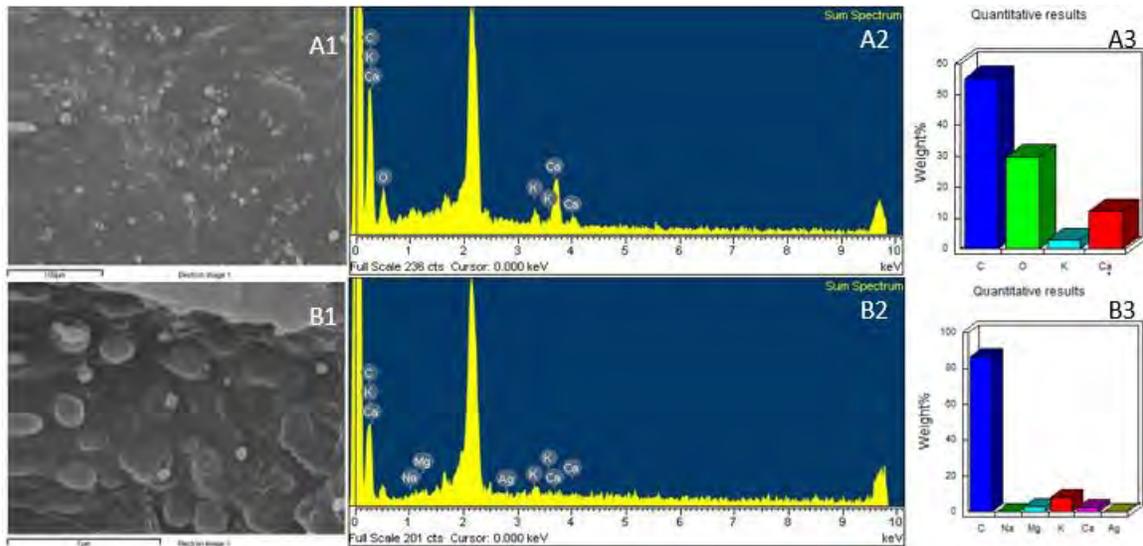


Figura 31. Análisis MEB y EDS de tallo de *H. undatus*. A1) Fotografía MEB del exterior de tallo control sin *BvAgNP*. A2) EDS del exterior de tallo control sin *BvAgNP*. A3) Concentración de elementos EDS en exterior de tallo control sin *BvAgNP*. B1) Fotografía MEB del exterior de tallo con 1000 mg/L de *BvAgNP*. B2) EDS del exterior de tallo con 1000 mg/L de *BvAgNP*. B3) Concentración de elementos EDS en exterior de tallo con 1000 mg/L de *BvAgNP*.

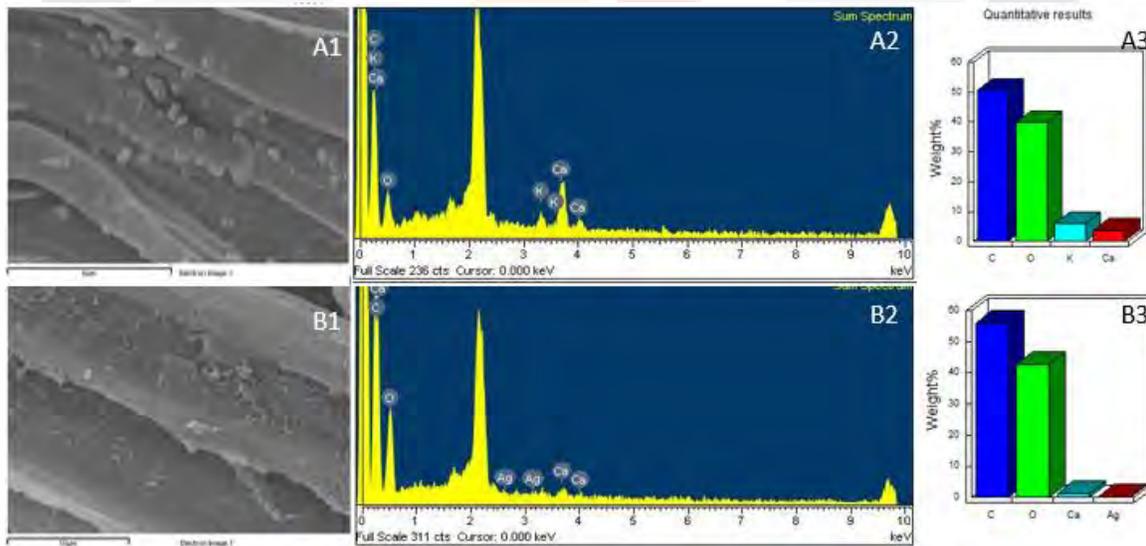


Figura 32. Análisis MEB y EDS de raíz de *H. undatus*. A1) Fotografía MEB de interior de raíz control sin *BvAgNP*, A2) EDS de interior de raíz control sin *BvAgNP*, A3) Concentración de elementos interior de raíz control sin *BvAgNP*, B1) Fotografía MEB de interior de raíz control con 1000 mg/L de *BvAgNP*, B2) EDS de interior de raíz con 1000 mg/L de *BvAgNP*, B3) Concentración de elementos de interior de raíz con 1000 mg/L de *BvAgNP*.

6.6.2 Tratamientos de BvAgNP en *M. bombycina* y *H. undatus in vitro*.

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas con BvAgNP a altas concentraciones, se decidió tomar como concentración máxima 100 mg/L de BvAgNP para los tratamientos, debido a que fue la concentración a la cual se detecta menor respuesta tóxica en las plantas. Tanto para *M. bombycina* como para *H. undatus in vitro* se evaluó el efecto de BvAgNP a 25, 50 y 100 mg/L y un control sin BvAgNP, en su crecimiento y desarrollo. Para esto se consideró la morfología macro y microscópica, indicadores bioquímicos de estrés oxidativo y expresión génica. Cada especie de cactácea se comportó de forma diferente.

6.6.2.1 Evaluación de características físicas de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro* tratadas con BvAgNP.

Se evaluaron los cambios presentados en los explantes de *M. bombycina* y *H. undatus* cultivados con 3 diferentes concentraciones de BvAgNP y un control sin BvAgNP tras 90 días de incubación, comparando con el día 0 (Figuras 33 y 35).

Para *M. bombycina in vitro*, se reportó un aumento de peso en todos los tratamientos, sin diferencias significativas entre ellos y el control (Tabla 14), igualmente la elongación final del explante no demostró diferencias significativas respecto al control, aunque la elongación de los explantes fue mayor en el tratamiento con 50 mg/L que con 100 mg/L de BvAgNP (Tabla 14). Para evaluar la brotación se promedió el número de brotes y además se consideró la longitud promedio de éstos, puede apreciarse que en ambos aspectos no hubo una influencia significativa de los tratamientos con BvAgNP respecto al control (Figuras 33 y 34). Igualmente, para evaluar el enraizamiento se promedió número de raíces principales producidas y se consideró el promedio de su longitud final, todos los tratamientos con BvAgNP ejercieron una disminución estadísticamente significativa en la cantidad de raíces producidas por *M. bombycina* (Figura 34), mientras para la longitud de las raíces se mostró una disminución con el tratamiento de 100 mg/L respecto al control, el tratamiento de 50 mg/L provocó mayor elongación de raíces sin considerar al control (Figura 34). Se detectó contaminación en el 20% de los explantes control, mientras que en los explantes tratados con BvAgNP no se detectó contaminación aparente. No se detectó necrosis en los diferentes tratamientos. El 0% de los explantes control produjeron callo, sin

embargo, los explantes tratados con *BvAgNP* a concentraciones de 25, 50 y 100 mg/L tuvieron el 20, 13.13 y 6.66% de producción de callo en sus explantes respectivamente.

Por otro lado, para *H. undatus in vitro*, hubo aumento de peso en todos los tratamientos, pero sin diferencias significativas entre ellos y el control (Tabla 14), tampoco la elongación de los explantes se vio alterada por los tratamientos con *BvAgNP* respecto al control (Tabla 14). En cuanto a la brotación, el tratamiento de 25 mg/L de *BvAgNP* produjo en promedio mayor cantidad de brotes que el control (Tabla 14), aunque la elongación promedio de los brotes fue igual para todos los tratamientos y el control (Tabla 14). Los resultados del enraizamiento no mostraron diferencias significativas en la cantidad de raíces principales producidas bajo ninguno de los tratamientos respecto al control (Tabla 14), sin embargo, el tratamiento de 25 mg/L de *BvAgNP* mostró claramente una mayor longitud de raíces principales en *H. undatus* (Tabla 14). Los explantes tratados con *BvAgNP* mostraron un aumento en la cantidad de raíces secundarias producidas respecto al control (Figura 36) y en el caso de las raíces aéreas, los resultados fueron similares, aunque la mayor elongación de raíces se obtuvo en los tratamientos de 25 y 100 mg/L respecto al control (Figura 36). No se detectó contaminación ni formación de callo en los diferentes tratamientos, sin embargo, el 20% de los explantes tratados con 100 mg/L de *BvAgNP* presentaron necrosis.

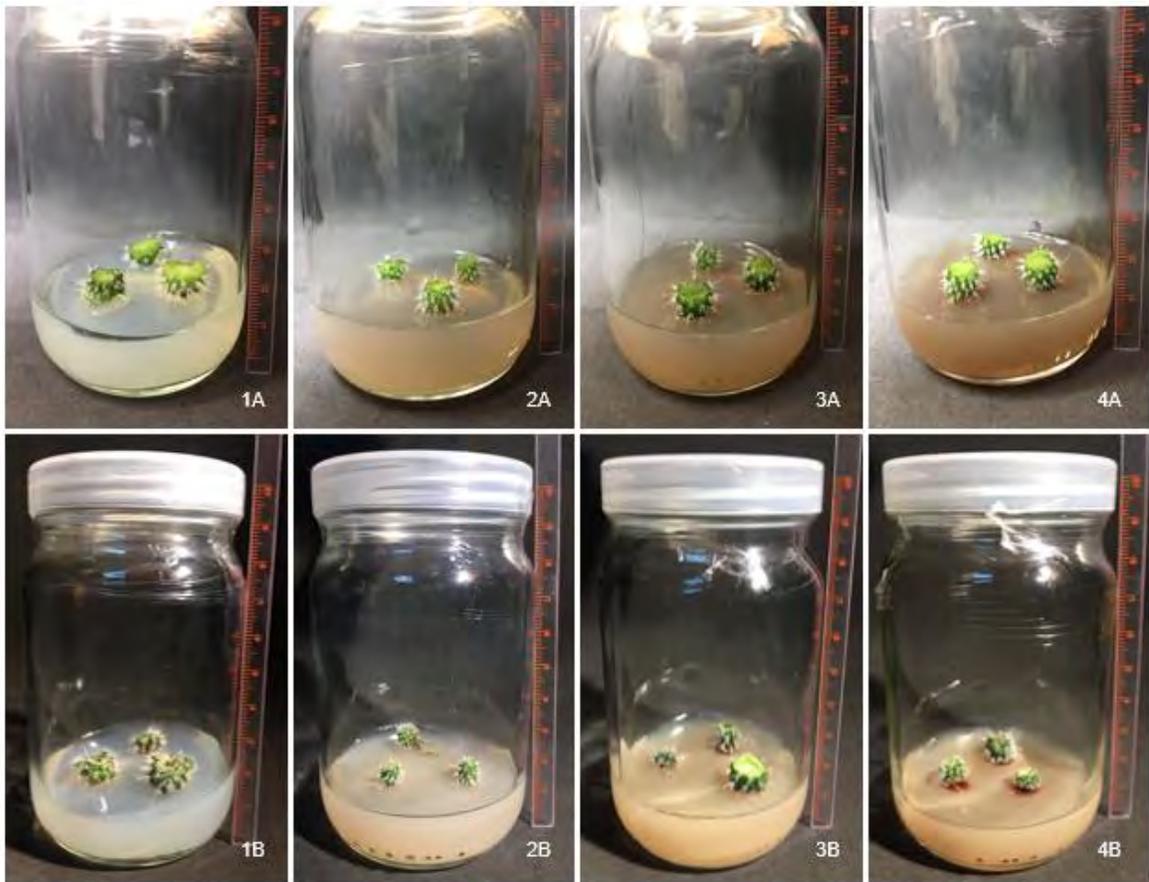


Figura 33. Efecto de *BvAgNP* en el crecimiento y desarrollo de *M. bombycina in vitro*. A) Día 0 de incubación; B) Día 90 de incubación; 1) Control, medio MS; 2) *BvAgNP* 25 mg/L; 3) *BvAgNP* 50 mg/L; 4) *BvAgNP* 100 mg/L.

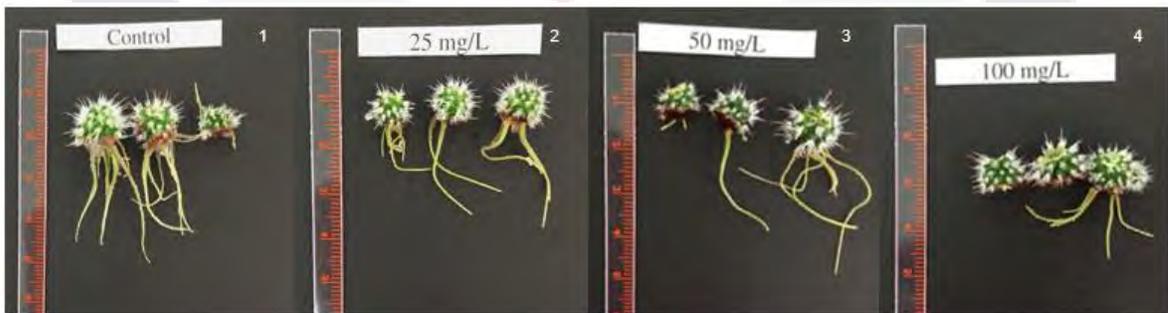


Figura 34. Explantes de *M. bombycina in vitro* tras 90 días de tratamiento con *BvAgNP*. 1) Control sin *BvAgNP*; 2) *BvAgNP* 25 mg/L; 3) *BvAgNP* 50 mg/L; 4) *BvAgNP* 100 mg/L.

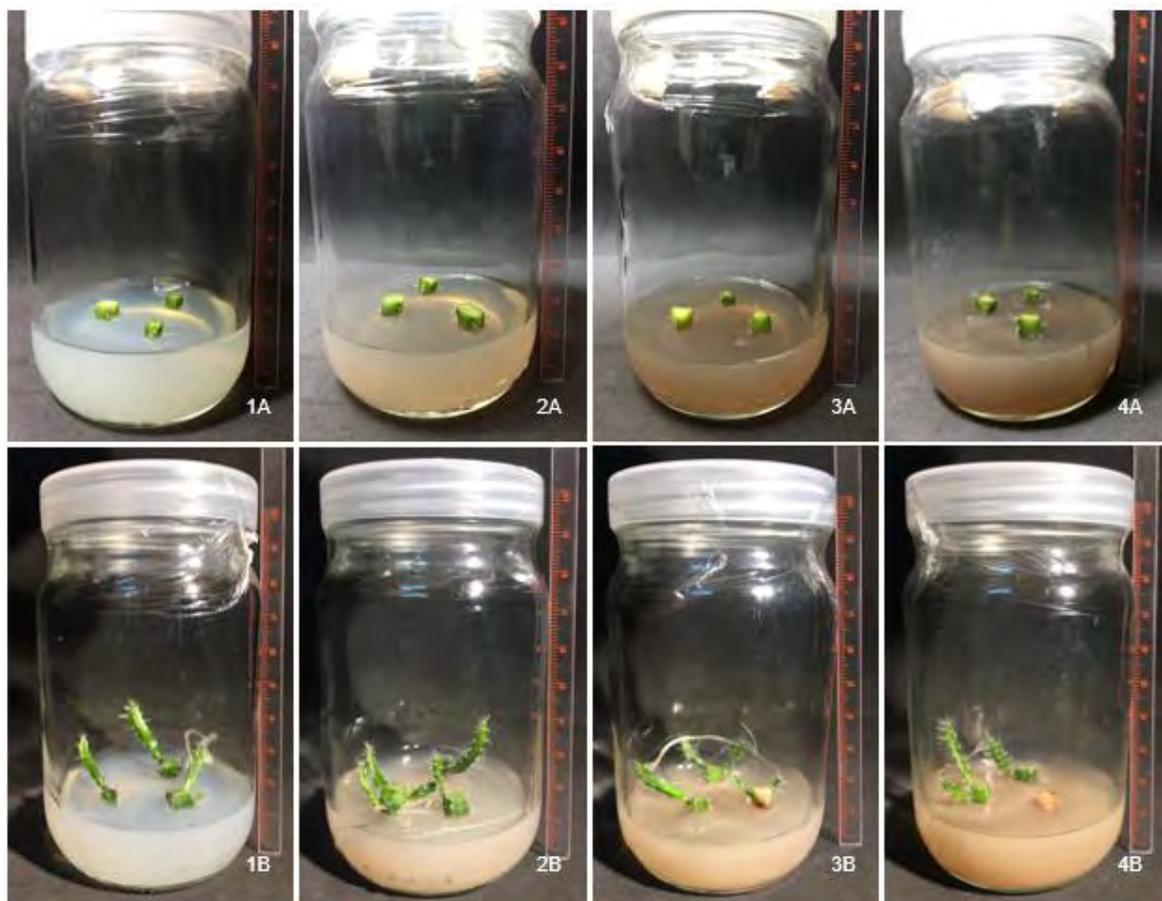


Figura 35. Efecto de BvAgNP en el crecimiento y desarrollo de *H. undatus in vitro*. A) Día 0 de incubación; B) Día 90 de incubación; 1) Control, medio MS; 2) BvAgNP 25 mg/L; 3) BvAgNP 50 mg/L; 4) BvAgNP 100 mg/L.



Figura 36. Explantes de *H. undatus* *in vitro* tras 90 días de tratamiento con *BvAgNP*. 1) Control sin *BvAgNP*; 2) *BvAgNP* 25 mg/L; 3) *BvAgNP* 50 mg/L; 4) *BvAgNP* 100 mg/L.

Tabla 14. Características morfológicas en cactáceas *in vitro* tratadas con *BvAgNP*

<i>M. bombycina</i>				
	Control	25 mg/L <i>BvAgNP</i>	50 mg/L <i>BvAgNP</i>	100 mg/L <i>BvAgNP</i>
Aumento de peso (Proporción)	1.5476 ± 0.2036 a	1.5698 ± 0.1428 a	1.3160 ± 0.06951 a	1.3609 ± 0.4433 a
Longitud de explante (Proporción)	1.4076 ± 0.1105 ab	1.3016 ± 0.3540 ab	1.6935 ± 0.2571 a	1.2352 ± 0.0730 b
Cantidad de brotes (Unidad)	0.6667 ± 0.7817 a	0.0667 ± 0.1491 a	0.2667 ± 0.3651 a	0.0 ± 0.0 a
Longitud de brotes (cm)	0.2200 ± 0.1304 a	0.1 ± 0.0 a	0.15 ± 0.05773 a	0.0 ± 0.0 a
Cantidad de raíces (Unidad)	7.3333 ± 2.1082 a	1.7333 ± 1.5882 b	3.2000 ± 0.9888 b	1.8000 ± 0.1826 b
Longitud de raíces (cm)	2.0997 ± 0.7029 a	1.7469 ± 0.9340 ac	2.4080 ± 1.5110 ab	1.2621 ± 0.6009 c
Callo (Frecuencia porcentual)	0.0 ± 0.0	20 ± 44.7213	13.3333 ± 18.2574	6.6666 ± 14.9071
Plantas con necrosis (%)	0.0	0.0	0.0	0.0

Plantas contaminadas (%)	20	0.0	0.0	0.0
<i>H. undatus</i>				
	Control	25 mg/L BvAgNP	50 mg/L BvAgNP	100 mg/L BvAgNP
Aumento de peso (Proporción)	3.5742 ± 1.0440 a	4.2416 ± 1.6809 a	4.3735 ± 1.0559 a	2.7136 ± 0.7209 a
Longitud de explante (Proporción)	1.1329 ± 0.1383 a	1.1929 ± 0.0614 a	1.1741 ± 0.0806 a	1.2400 ± 0.1113 a
Cantidad de brotes (Unidad)	1.3333 ± 0.3333 a	2.0667 ± 0.3651 b	1.9333 ± 0.6412 ab	1.3333 ± 0.3333 a
Longitud de brotes (cm)	1.5158 ± 0.7078 a	2.0084 ± 0.9303 a	1.7605 ± 0.8860 a	1.6217 ± 0.9941 a
Cantidad de raíces principales (Unidad)	1.1333 ± 0.1826 a	1.4000 ± 0.4346 a	1.5333 ± 0.6055 a	1.0000 0.4714 a
Longitud de raíces principales (cm)	5.4548 ± 2.9907 a	10.9660 ± 6.6400 b	7.6932 ± 5.0147 ab	8.9611 ± 4.1161 ab
Cantidad de raíces aéreas (Unidad)	1.4667 ± 0.8367 a	2.2000 ± 1.2156 a	1.1333 ± 0.3801 a	0.6667 ± 0.6667 a
Longitud de raíces aéreas (cm)	1.6127 ± 1.3254 a	4.3748 ± 3.8936 b	4.2391 ± 1.6390 ab	5.4385 ± 3.4960 b
Callo (Frecuencia porcentual)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Plantas con necrosis (%)	0.0	0.0	0.0	20 ± 18.2541
Plantas contaminadas (%)	0.0	0.0	0.0	0.0

Valores (media ± SD, n = 15) letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de comparación de medias con el método de Tuckey ($\alpha=0.05$).

6.6.2.2 Evaluación del contenido de clorofila en *M. bombycina* y *H. undatus* in vitro tratadas con BvAgNP.

El análisis demostró que los tratamientos con BvAgNP solo disminuyeron el contenido de clorofila b y clorofilas totales con respecto al control en raíz de *M. bombycina* tratadas con 100 mg/L de BvAgNP. Mientras que en *H. undatus* se produjo un aumento significativo en la clorofila a en tallo con 25 mg/L de BvAgNP, y en raíz un aumento en clorofila a con 25 y 100 mg/L de BvAgNP y de clorofilas totales con 25 mg/L de BvAgNP (Figura 37).

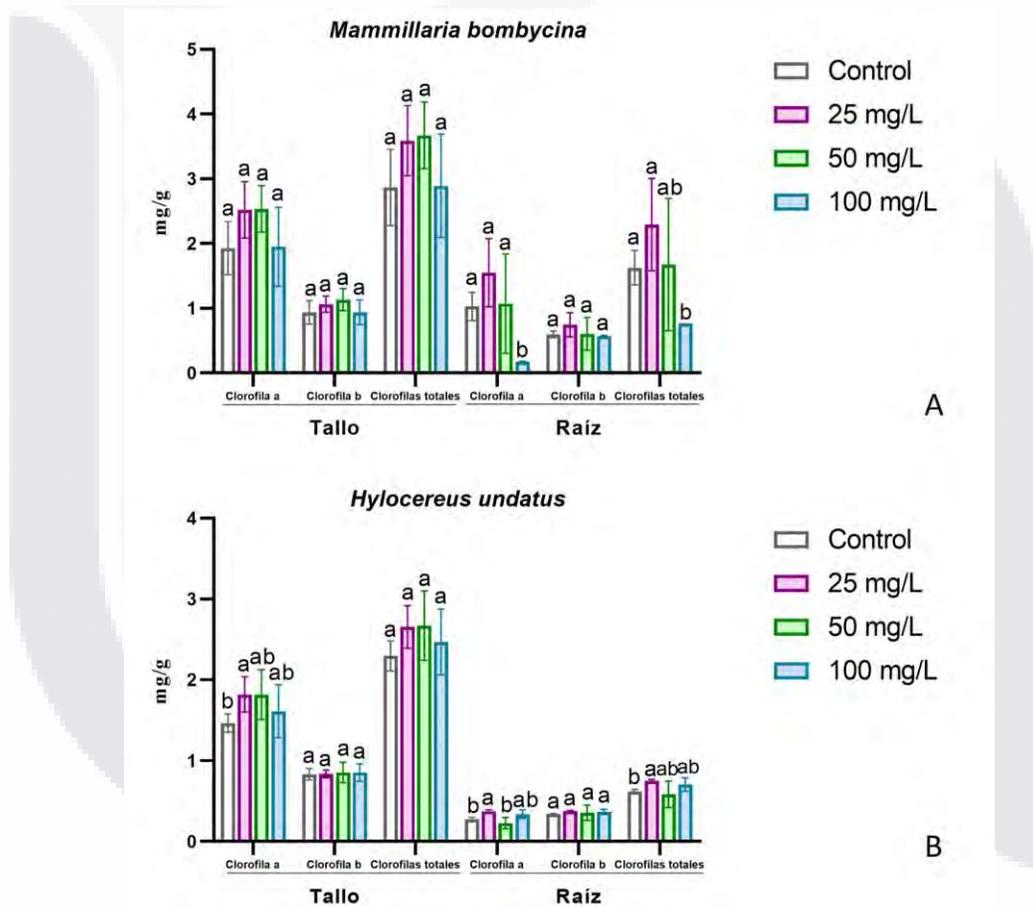


Figura 37. Contenido de clorofilas en *M. bombycina* y *H. undatus* tratadas con BvAgNP. Contenido de clorofilas en tallo y raíz de A) *M. bombycina* y B) *H. undatus* tratadas con BvAgNP, letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras según la prueba de comparación de medias con el método de Tuckey ($\alpha= 0.05$).

6.6.2.3 Evaluación del contenido de betalainas en *M. bombycina* y *H. undatus* in vitro tratadas con BvAgNP.

El análisis demostró que los tratamientos con BvAgNP disminuyeron el contenido de betacianinas y betaxantinas en raíz de *M. bombycina* en tratamiento con 100 mg/L de BvAgNP (Figura 38 A). Por otro lado, en tallo y raíz de *H. undatus* tratados con BvAgNP no se reportan diferencias significativas de betacianinas y betaxantinas con respecto al control sin BvAgNP (Figura 38 B).

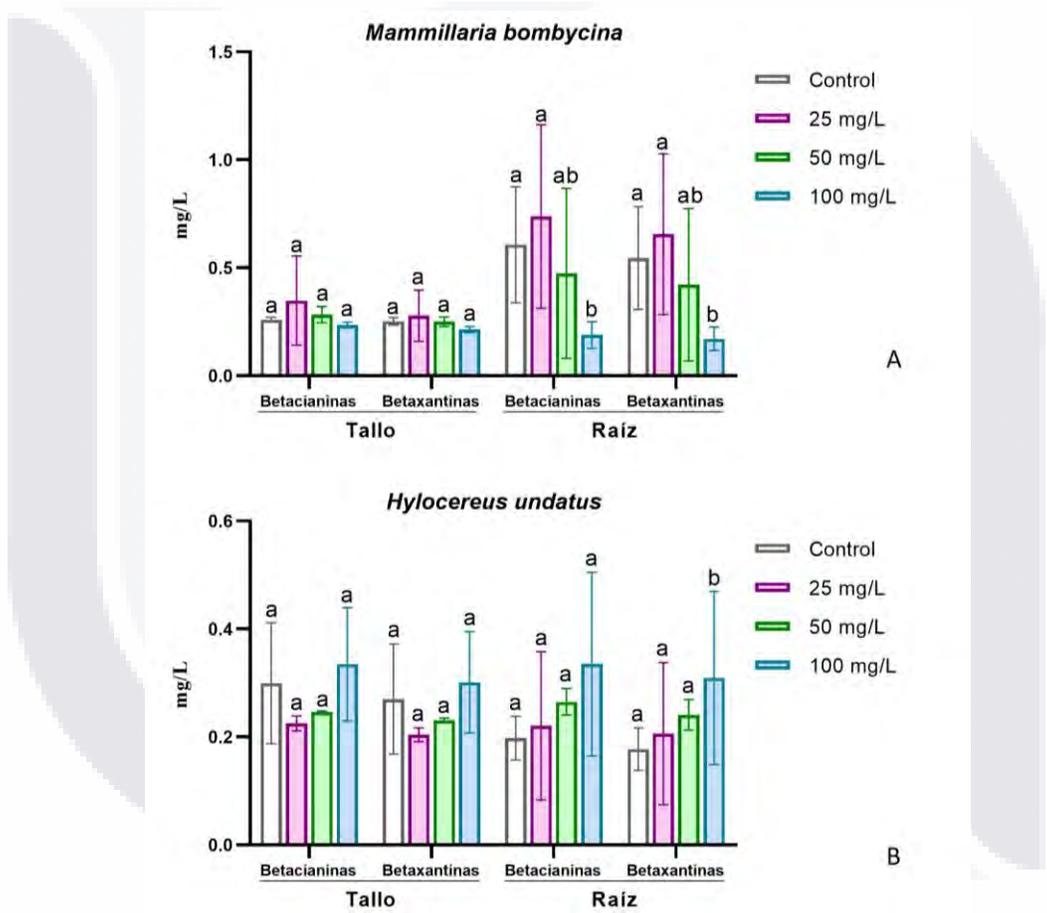


Figura 38. Contenido de betalainas en *M. bombycina* y *H. undatus* tratadas con BvAgNP Se reportan betacianinas y betaxantinas en tallo y raíz de A) *M. bombycina* y B) *H. undatus*. Letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras, según la prueba de comparación de medias con el método de Tuckey ($\alpha= 0.05$)

6.6.2.4 Evaluación de la actividad catalasa en *M. bombycina* y *H. undatus* in vitro tratadas con BvAgNP.

La prueba de actividad catalasa reveló que los tratamientos con BvAgNP disminuyeron las unidades de catalasa (CAT) para *M. bombycina* a 25 y 50 mg/L respecto al control (Figura 39 A). Mientras que para *H. undatus* hubo un aumento en las unidades CAT para las plantas tratadas con 100 mg/L de BvAgNP, con un promedio de 0.0071 unidades CAT, a diferencia del control que tuvo en promedio 0.0012 unidades CAT (Figura 39 B).

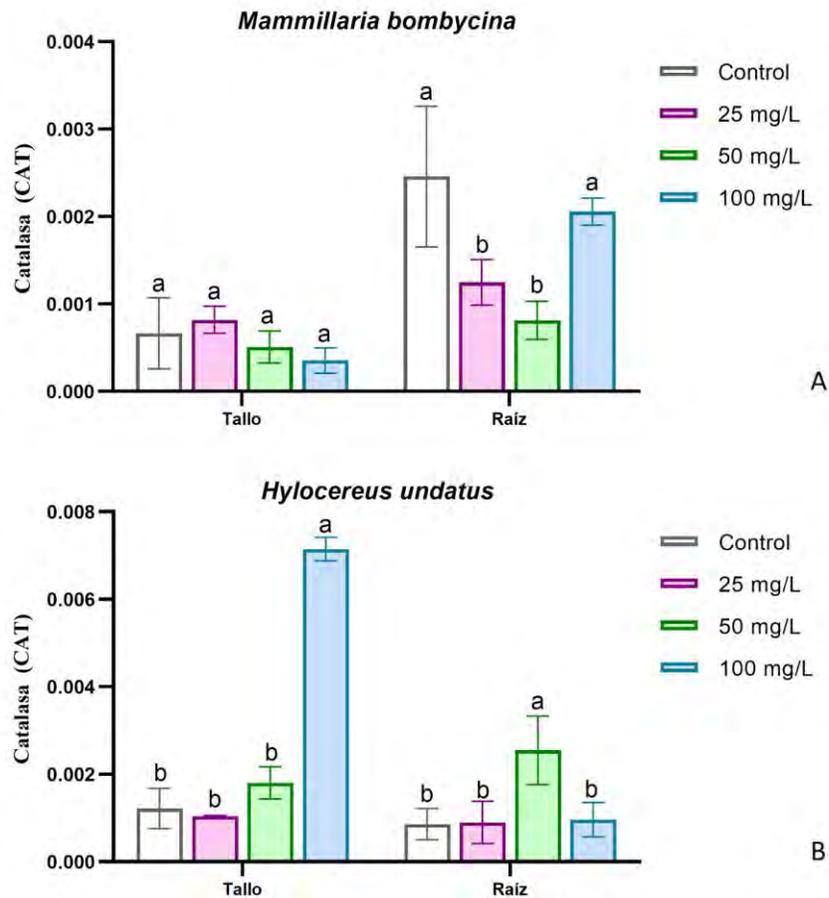


Figura 39. Actividad Catalasa de *M. bombycina* y *H. undatus* in vitro tratadas con BvAgNP. Actividad catalasa de tallo y raíz de A) *M. bombycina* y B) *H. undatus*. Letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras, según la prueba de comparación de medias con el método de Tuckey ($\alpha= 0.05$).

6.6.2.5 Evaluación de morfología microscópica de *M. bombycina* y *H. undatus* *in vitro* tratadas con BvAgNP.

El análisis micromorfológico de explantes *M. bombycina* y *H. undatus* *in vitro* tratados con BvAgNP revela acumulación de cristales y vacuolas teñidas de rojo en el interior de las células (Figura 40 y 41), cuya concentración aumenta al aumentar la concentración de BvAgNP (Tabla 15). En la tabla 15 puede observarse que a partir del tratamiento con 50 mg/L de BvAgNP, tanto para *M. bombycina* como para *H. undatus* hay un aumento significativo en la cantidad de vacuolas acumuladas por célula.

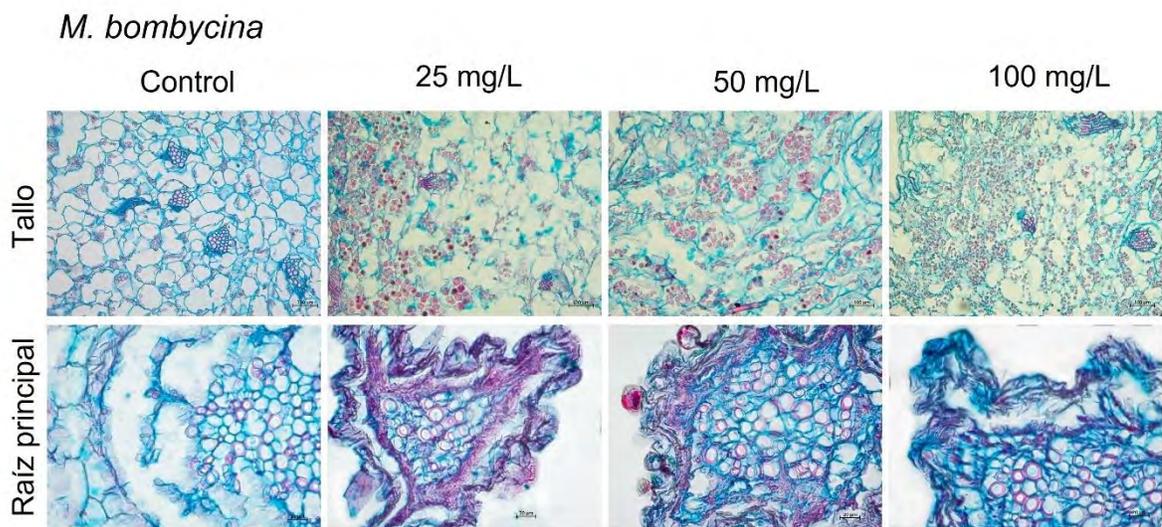


Figura 40. Micromorfología de tallo y raíz de *M. bombycina*. Fotografías en microscopio óptico de cortes transversales de tallo de explante (10X) y raíz principal (40X) teñidas con safranina y azul de alcian.

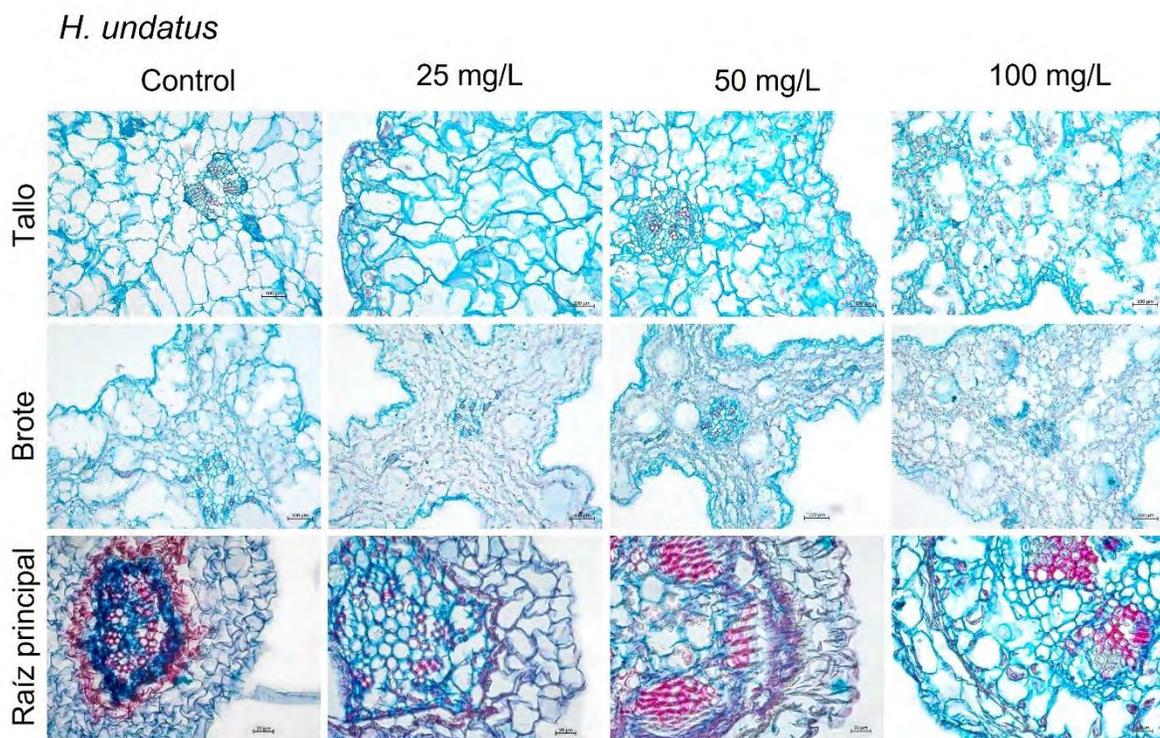


Figura 41. Micromorfología de tallo y raíz de *H. undatus*. Fotografías en microscopio óptico de cortes transversales de tallo de explante y brote (10X) y raíz principal (40X) teñidas con safranina y azul de alcian.

Tabla 15. Vacuolas en *M. bombycina* y *H. undatus* tratados con BvAgNP.

Tratamiento con BvAgNP	Cantidad de vacuolas por célula	
	<i>M. bombycina</i>	<i>H. undatus</i>
	Tallo	Tallo
Control	8.67 ± 0.81 a	2.20 ± 0.40 a
25 mg/L	11.87 ± 0.81 ab	4.60 ± 0.72 ab
50 mg/L	13.73 ± 1.68 b	6.53 ± 1.17 b
100 mg/L	14.87 ± 2.23 b	10.33 ± 1.72 c

Se presenta la media ± la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el método de Tuckey ($\alpha=0.05$).

6.6.2.6 Análisis por MEB y EDS de *M. bombycina* y *H. undatus* *in vitro* tratadas con BvAgNP.

Se realizó un análisis MEB de tallo y raíz de *M. bombycina* (Figura 42) y *H. undatus* (Figura 43) de los explantes tratados con 25, 50 y 100 mg/L de BvAgNP y explantes control sin BvAgNP. Además, un análisis de elementos EDS en zonas de interés con sospecha de

presencia de plata proveniente de *BvAgNP* de tallo y raíz de ambas plantas, tomando para cada muestra de 3 a 4 puntos de muestreo distribuidos entre el sistema vascular y células con acumulación de cristales (Figuras 44).

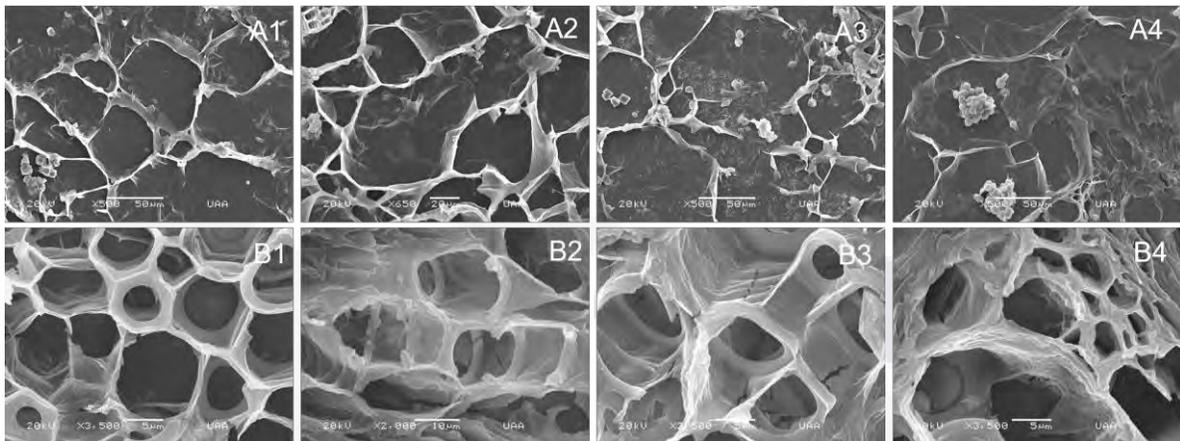


Figura 42. Fotografías por MEB de tallo y raíz de *M. bombycina*. Cortes transversales de zona media A1) tallo control sin *BvAgNP*, A2) tallo con 25 mg/L de *BvAgNP*, A3) tallo con 50 mg/L de *BvAgNP*, A4) tallo con 100 mg/L de *BvAgNP*, B1) raíz control sin *BvAgNP*, B2) raíz con 25 mg/L de *BvAgNP*, B3) raíz con 50 mg/L de *BvAgNP*, B4) raíz con 100 mg/L de *BvAgNP*

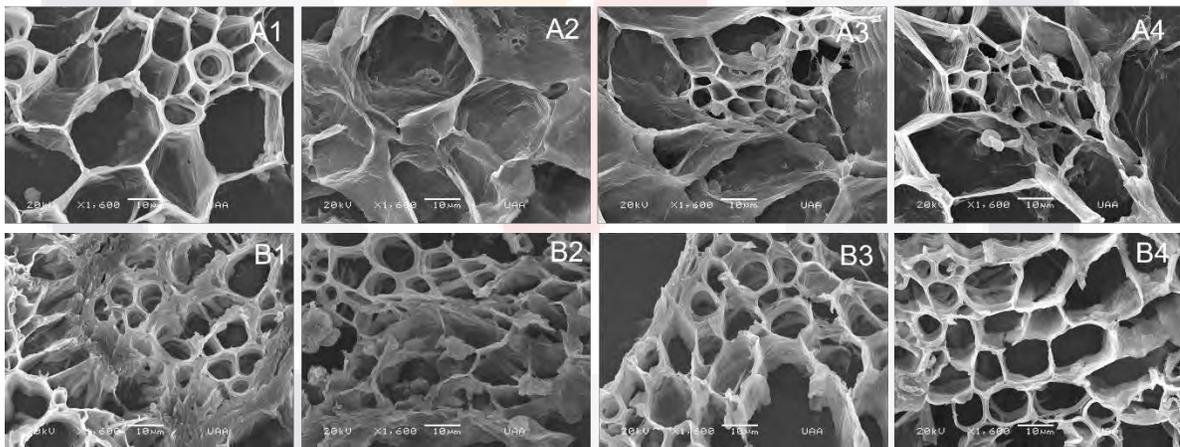


Figura 43. Fotografías por MEB de tallo y raíz de *H. undatus*. Cortes transversales de zona media A1) tallo control sin *BvAgNP*, A2) tallo con 25 mg/L de *BvAgNP*, A3) tallo con 50 mg/L de *BvAgNP*, A4) tallo con 100 mg/L de *BvAgNP*, B1) raíz control sin *BvAgNP*, B2) raíz con 25 mg/L de *BvAgNP*, B3) raíz con 50 mg/L de *BvAgNP*, B4) raíz con 100 mg/L de *BvAgNP*

Tanto en el control como en los explantes tratados con *BvAgNP* se tiene acumulación de cristales salinos, sin embargo, dicha acumulación es más evidente en tallo de *M. bombycina* y *H. undatus* tratado con 100 mg/L de *BvAgNP* (Figura 42 y 43; A). En *M.*

bombycina se aprecia acumulación de vacuolas. No se detectan nanopartículas acumuladas en ninguna de las muestras.

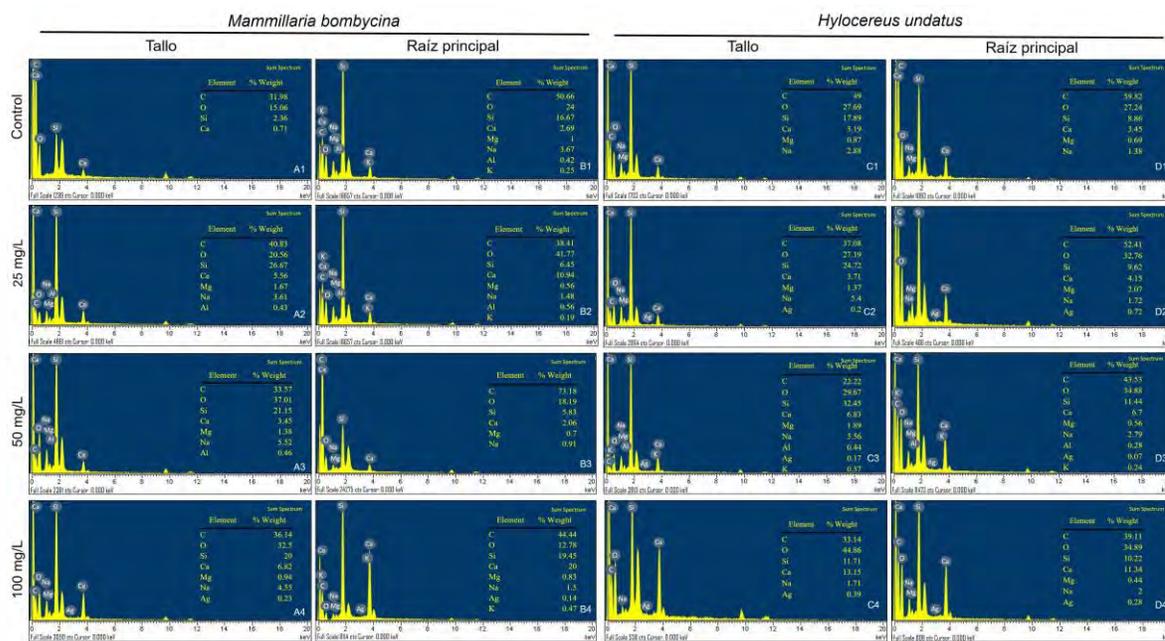


Figura 44. Análisis de elementos por EDS en tallo y raíz de *M. bombycina* y *H. undatus*. Tallo de *M. bombycina* en los tratamientos control (A1), 25 (A2), 50 (A3) y 100 (A4) mg/L de BvAgNP; Raíz de *M. bombycina* en los tratamientos control (B1), 25 (B2), 50 (B3) y 100 (B4) mg/L de BvAgNP; Tallo de *H. undatus* en los tratamientos control (C1), 25 (C2), 50 (C3) y 100 (C4) mg/L de BvAgNP; Raíz de *H. undatus* en los tratamientos control (D1), 25 (D2), 50 (D3) y 100 (D4) mg/L de BvAgNP.

En tallo control de *M. bombycina* no fue detectada la presencia de plata en ninguno de los puntos de muestreo, mientras que en tallo con 25, 50 y 100 mg/L de BvAgNP se detectó presencia de plata en el 50 %, 0 % y 66.6 % de los puntos de muestreo. En raíz de *M. bombycina* control sin BvAgNP y con 25, 50 y 100 mg/L de BvAgNP, se detectó presencia de plata en el 33.33% 0 %, 0 % y 25 % de los puntos de muestreo respectivamente (Figura 44). Por otro lado, para tallo de *H. undatus* control sin BvAgNP y con, 50 y 100 mg/L de BvAgNP, se detectó presencia de plata en el 0 %, 100 %, 33.33 % y 33.33 % de los puntos de muestreo respectivamente, mientras que en raíz se detectó en el 0 %, 33.33 %, 50 % y 100 % de los puntos de muestreo respectivamente (Figura 44).

6.7 Análisis de la microbiota asociada a cultivos *in vitro* de *M. bombycina* y *H. undatus* tratados con *BvAgNP*.

6.7.1 Cuantificación de microorganismos por cuenta viable de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro* tratadas con *BvAgNP*.

En *M. bombycina* se reporta un aumento significativo en las UFC/gr de tallo tratado con 50 mg/L de *BvAgNP* comparado con el control, en los medios PDA, PY y YPD. Sin embargo, se reporta una disminución significativa en las UFC/gr de raíz de los explantes tratados con 50 mg/L de *BvAgNP* comparado con el control en los tres medios de cultivo utilizados (Figura 45).

En *H. undatus* se tuvo una disminución significativa en las UFC/gr de tallo tratado con 25 mg/L de *BvAgNP* en PDA, sin embargo, a 50 mg/L de *BvAgNP* se reporta aumento significativo con respecto al control en PY y YPD. Por otro lado, en las raíces de los explantes tratados con *BvAgNP*, se tuvo disminución significativa de las UFC/gr a partir de los 25 mg/L de *BvAgNP* en PDA, en PY no se encontraron cambios y en YPD se tuvo una disminución en las UFC/gr a los 25 mg/L de *BvAgNP* pero a los 50 mg/L un aumento significativo con respecto al control (Figura 46).

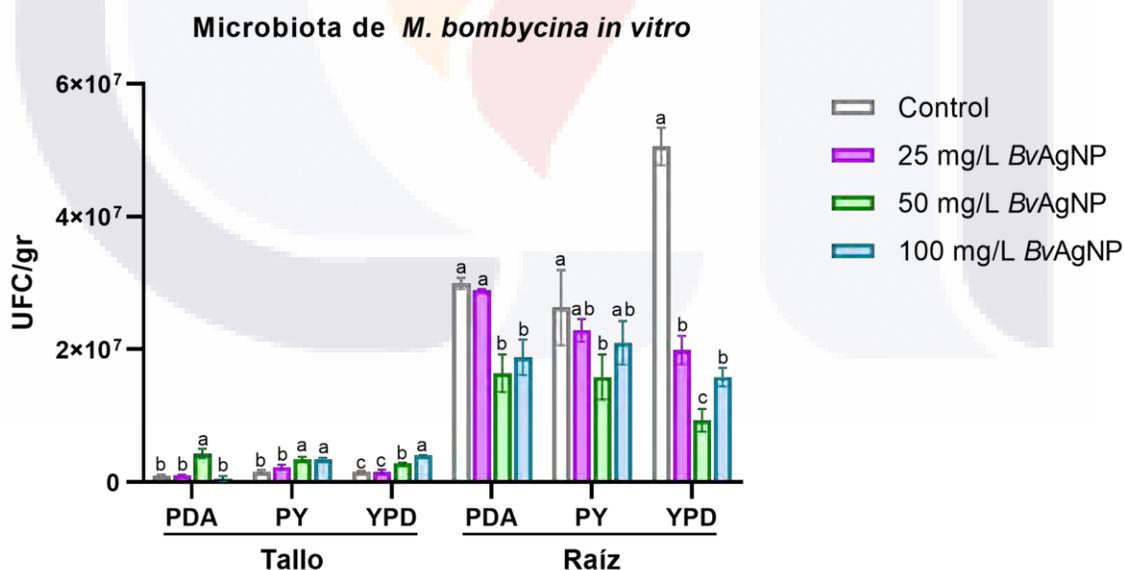


Figura 45. Cuenta viable de microbiota asociada a *M. bombycina in vitro* tratada con *BvAgNP* a diferentes concentraciones. Se grafica la media y la desviación estándar de los tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el método de Tukey ($\alpha=0.05$).

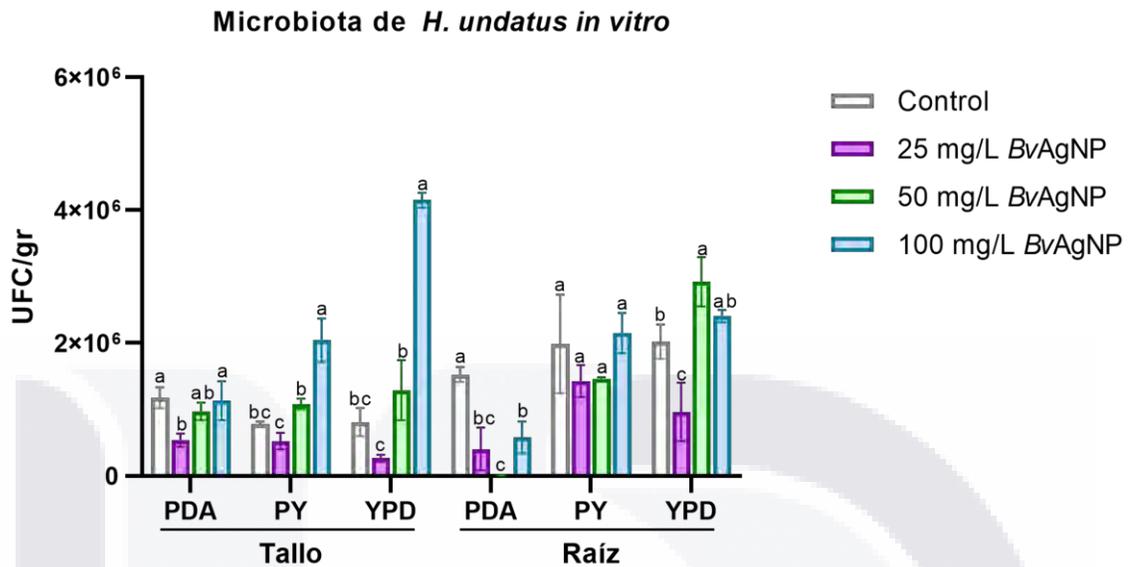


Figura 46. Cuenta viable de microbiota asociada a *H. undatus in vitro* tratada con BvAgNP a diferentes concentraciones. Se grafica la media y la desviación estándar de los tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el método de Tukey ($\alpha=0.05$).

6.8 Análisis de expresión de genes glioxalasa de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro* tratadas con BvAgNP.

6.8.1 Identificación de genes glioxalasa en *H. undatus*.

Se identificó por PCR la presencia de genes glioxalasa *I-I*, *I-IV* y *DJ-1* en cDNA de *H. undatus* mediante oligonucleótidos diseñados a partir de *M. bombycina* por Enríquez-González *et al.* (2021).

Tras la secuenciación se obtuvieron regiones de 862 pb para el fragmento amplificado con los oligonucleótidos MbGlyI-I denominado *HuGlyI-I* (Figura 47). Sin embargo, tras el análisis *in silico* no se obtuvo resultados concretos para los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos MbGlyI-IV y MbGlyDJ-I, por lo que fueron descartados.

En el alineamiento de *HuGlyI-I* se obtuvo homología de 83.81% con la secuencia lactoilglutación liasa-like de *Hevea brasiliensis* (XM_021782983.1:305-619) que corresponde a una lactoilglutación liasa o glioxalasa tipo I (Figura 47).

<p>Región secuenciada <i>in vitro</i></p> <p>>Gly I-I en <i>H. undatus</i></p> <p>CGTTCTGCTACTTGCCAAGGTTACTGCACAAGTGCTCAAGGTTACTGCAGATTGTGGAGGTGACTGCACAGTTGGCTT CGTTAACGGACGATTGTCAAGGTTGCCGCAATGTTGCTCCCAAGGTAGCTTCCTGCTTGGGCTGTGCACCCAATTAA GGACCCGATGGTAAGGTTGGAGTACTATTCTCGAGTACTGGGCATGTGCTGCTTAAGAGGGTGGACTTTCCTGAG ATGAAGTTCAGCTTGTATTTCCTTGGTTATGAGGATACTGCATCAGCTCCAAGTGACCCGGTGGATCGTACTGTTGG ACTTTTAGCAAGAAAGCTACAATTGAACCTACCCACAAGTGGGGAACAGAAAGTGATCCTGAATTCATGGTTATCAC AATGGAAACACAGACCCCTCGTGGCTTCGGTAAATGAAAGGGATAGCTTTTATAAAGGATCCTGATGGCTATTGGATT GAAATATTTGACCTTAAAACAATTGGAAAGGTTACTGCACAATTGGAAAGGTTACTGCACAATTGGAAAGGTTACTGC ACAATTGGAAAGGTTACTGCACAATTGGAAAGGTTACTGCACAATTGGAAAGGTTACTGCACAATTGGAAAGGTTACT GCACAATTGTAAGGTTACTGCACAATTGTAAGGTTACTGCACAATTGTAAGGTTACTGCACAAGTACTAGTAGAGGTT ACTGCACAATTGTAAGGTTGCTGCACCAACTAGTAAAGGATGACTGCACCCTAGTAGGATGCTGCACCAACTGGT AGAGATTGCTGCACCCATGAGTAGGAGGCTGCAGAATAGAAAAAGCTACCCAACCGCTAGGGATCCTTACGACTAC GAGGGAGGTT</p>
<p>Proteína predicha</p> <p>> Gly I-I en <i>H. undatus</i></p> <p>MVRLEYYSRVLGMSLLKRVDPFEMKFSLYFLGYEDTASAPSDPVDRTVWTFSKKATIELTHNWGTESDPEFNGYHNGNT DPRGFGKMKGIAFIKDPDGYWIEIFDLKTIGKVTAQLERLLHNWKGYCTIGKVTAQLERLLHNWKGYCTIGKVTAQL</p>

Figura 47. Análisis *in silico* de fragmento secuenciado *HuGlyI-I*. Región secuenciada de 862 pb y proteína predicha de 156 aa.

6.8.2 Identificación *in silico* de genes glioxalasa en *H. undatus*.

Las secuencias pertenecientes a *MbGlyII-I* y *MbGlyDJ-I* de *M. bombycina* (Enríquez-González *et al.*, 2021) se alinearon contra el genoma de *S. undatus* reportado en el recurso de datos SRA (Sequence Read Archive) del NCBI con el Bioproject ID PRJNA691451 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/99797>) (Chen *et al.*, 2021). Se obtuvieron dos fragmentos de ADN de 6784 pb y 4086 pb respectivamente, correspondientes a las secuencias glioxalasa buscadas, a partir de los cuales se obtuvieron las regiones codificantes de 750 pb y 1176 pb, las cuales fueron denominadas *HuGlyII-I* y *HuGlyDJ-I* respectivamente (Figura 48). Posteriormente la proteína predicha para *HuGlyII* tuvo 249 aa y la predicha para *HuGlyDJ-I* 391 aa (Figura 48).

<p>Región codificante <i>in silico</i></p> <p>>HuGly II</p> <p>GTACCATGTCTTAAGGACAACACTATGCATATCTCTTGCTTGATGAGAATACTGGTACTGTTGGTGTGGTTGATCCATCT GAAGCGGTGCCTGTTATTGATGCCCTGGCCAAAAAATAGAAACCTGAATTACATACTAAATACTCATCACTACT GATCACACTGGTGGGAATATTGAGTTGAAAGAAAGGTACGGAGCAAAGTTATTGGCTCCAGGAGAGATAGACAGA GAATTCCTGGGATTGATATGGCTCTGAATGGCGGTGATCGATGGATGTTTGCAGGCCATGAAGTTCATGTGTTCCGA ACACCTGGGCATACAAGAGGGCACATTTGCTTCTATTTTCTGGATCTGGTGTCAATTTCACTGGAGACACACTCTTC AGTTTATCTTGCAGGAACTTTTGAAGGAACCCCTGAGGAGATGCTAGCTTCTCTTAAAGAGATCATGTCCTTAACA GATGAGACAAGTGTATTGCGGGCATGAATACACCCTGAGTAATTCAAAGTTTGCATTATCCATAGGCCAAATAAT GAAGCACTTTGGTCGATGCATCCCGCTAGCTCATTTACGCAACAAAGGCTTACCAACGATACCAACGACACTGAA ACTAGAGAAGGCATGCAATCCTTCTGCGATTATCAAGCCCCGAGATCCGGCAATCGTTAAACATTCTACCCACAG CTGATGATGCTGAAGCCTTGCATATCATACGCCAGGCCAAAAGATAACTTTTAG</p>
<p>Proteína predicha</p> <p>>HuGly II</p> <p>VPCLKNDYAYLLDENTGTVGVVDPSEAVPVIDALAQKRNRLNYILNTHHHYDHTGGNIELKERYGAKVIGSRDRQRIPGI DMALNGGDRWMFAGHEVHVFPGHTRGHICFYFPGSVIFTDLFLSLSCGKLFEGTPEEMLASLKKIMSLTDETSVYC GHEYTLNSKFNALSIEPNNEALWSYASRV AHLRNKGLPTIPTTLKLEKACNPFLRLSSPEIRQSLNLPADDAEALRIIRQAK DN</p>
<p>Región codificante <i>in silico</i></p> <p>>HuGlyDJ-I</p> <p>ATGGCGAACACCAAGGCCAGAAACGAGTTCTCATCTTCTGTGGCGATTATGTCGAAGATTATGAGATTATGGTGCC ATTTACAGGCACTCCAAGCTTACGGTGTAGCTGTTGATGCCGTTTGGCCCTGGAAAAAGGCCGGTGATATTTGCCGCA CTGCTGTCCACCAAAACGCTGGTCATCAGACTTACACAGAACACGAGGTCACAACCTTTGCCCTTAATGCAACCTTTG ACGAAATTGATGTGAGCAGCTATGACGGCTTGGTCGTTCTGGGGGAGAGCGCCAGAGTATCTTGAATGAATGA ATCACTTGTGACGTGGTTTGCATTTTCTCTCTGGGAAGGCAATTGCATCTATCTGCCATGGGCAGTTGATTCT GGCTGCCGCTGACTGTGTTAAAGGCCGTAATGCACAGCATATCCTCTGTGAGGCCTGTACTCATTGCAGCTGGTG CTAATTGGATAGAACCTGCAGGCATGGATGCTTGTGTCGTCGATGGCAATCTAGTGACCGGTGCCACATATGAAGGG CATCCTGAGTTCATTCAACTCTTTGTGAAGGCACTAGGAGGCACCATCACTGGTCTAGTAAACGGATCCTCTTTCT TGCGGGGATTTTCAAGATTATGAGATTATGGTACCTTTTCAAGCTTGGATGCCATGTTGATGCA GTTTGTCCCAAAAAGGGGAAAGGCGATGTCTGCGCAACTGCTATACATGATTTTTGAGGGTGACCAAACTTACAGCGA AAAGCCTGGCCATGATTTTAAATTGACAGCATCCTTTGATGATATTGATGCTTGTGATTATGATGGGCTTGTGGTCT GGAGGACGAGCCCCAGAGTACCTAGCTTTAGATGAGAAAGTTCTGGCCATAGTGAGGAGTTTTATGGAGGCTAAAA ACCAGTTGCATCTATTTGCCATGGCCAACAGATTTGGCTGCTGCTGGTGTCTCAAGGGGAAGAAATGTACAGCCT ACCCAGCTGTGAAGCTAAATGTGGTGTGGGAGCGCAAGTTGGTTGGAGCCTGAGCCAAATAGACCCTTGTTCAC GGACGGCAACTTGGTAACAGGAGCTGCTTGGCCAGGCCACCAGAAATTCATATCTCAGTTCATGGCGCTCCTCGGT ATCCGTGTAACATTCTAA</p>
<p>Proteína predicha</p> <p>>HuGlyDJ-I</p> <p>MANTKAQKRVLIFCGDYVEDYEIMVFPFQALQAYGVAVDVCPGKAGDICRTAVHQNAGHQTYTEQRGHNFALNATFDEI DVSSYDGLVVPGRAPPEYLAMNESLVDVVCKFSSSGKAIASICHGQLILAAADCVKGRKCTAYPPVRPVLIAAGANWIEPA GMDACVVDGNLVTGATYEGHPEFIQLFVKALGGTITGSSKRILFCGDFMEDYEIMVFPFQSLQALGCHVDAVCPKKGKD VCATAIHDFEGDQTYSEKPGHDFKLTASFDDIDVLSYDGLVVPGRAPPEYLALDEKVLAIVRFSFMEAKKPVASICHGQQILA AAGVLKGGKCTAYPAVKLNVLGGASWLEPEPIDRCFTDGNLVTGAAWPGHPEFISQFMALLGIRVTF</p>

Figura 48. Análisis *in silico* de fragmentos correspondientes a HuGlyII y HuGlyDJ-I. Regiones codificantes de 750 y 1176 pb y proteínas predichas de 249 y 391 aa respectivamente.

6.8.2.1 Búsqueda de dominios glioxalasa en *H. undatus*.

A partir de las proteínas predichas para HuGlyI-I, HuGlyII y HuGlyDJ-I se realizó el análisis de dominios, obteniendo resultados confirmantes de la correspondencia de los fragmentos obtenidos para cada tipo de glioxalasa esperado. Para HuGlyI-I se identificó como parte de una región glioxalasa por contener el dominio dihidroxidifenil dioxigenasa que contiene un motivo beta- α - β (3) de un grupo de metaloenzimas, el cual en las glioxalasa tipo I proporciona un entorno de coordinación de metales para catalizar

isomerizaciones (Figura 49). Para HuGlyI se identificó como un fragmento correspondiente a glioxalasa II por contener un dominio hidroxiaclglutación hidrolasa característico de las glioxalasa tipo II (Figura 49). Finalmente, para HuGlyDJ-I se identificó como un fragmento correspondiente a una glioxalasa tipo III por contener dos regiones DJ-I similares a glutamina amidotransferasas pertenecientes a las superfamilias DJ-I o Pfpl (Figura 49).

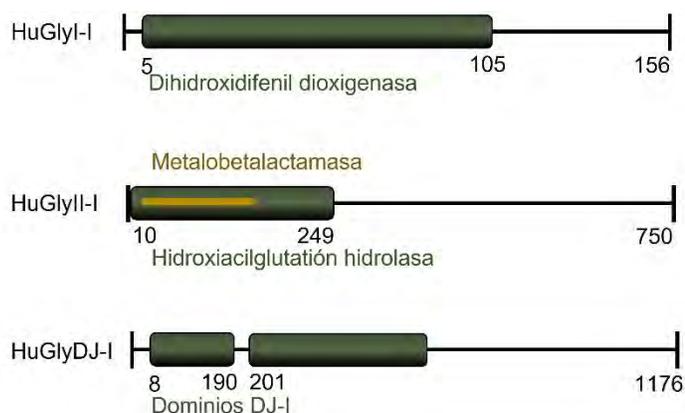


Figura 49. Dominios de proteínas Glioxalasa en *H. undatus*. Utilizando la herramienta InterPro de EMBL-EBI (Blum *et al.*, 2020).

6.8.2.2 Modelado estructural de proteínas glioxalasa en *H. undatus*.

Se obtuvieron estructuras 3D predichas para las proteínas de cada fragmento analizado. Para HuGlyI-I se obtuvo una proteína predicha con 2 regiones β -plegadas y 5 α hélices a partir de un templado correspondiente a la región lactoilglutacion liasa de *Gossypium hirsutum* (7vq6.1.A) con un 62.26% de identidad (Figura 50). Para HuGlyII la proteína predicha contuvo 2 regiones β -plegadas y 7 α hélices a partir de un templado correspondiente a la región hidroxiaclglutacion hidrolasa 2 de *A. thaliana* (2q42.1.A) con un 76.31% de identidad (Figura 50). Para HuGlyDJ-I se obtuvo una proteína predicha conformada por 3 subunidades a partir de un templado correspondiente a una proteína homologa DJ-I de *A. thaliana* (4ofw.1.A) con un 76.94% de identidad (Figura 50).

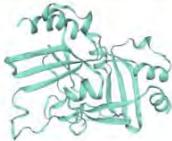
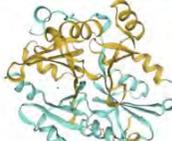
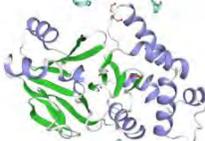
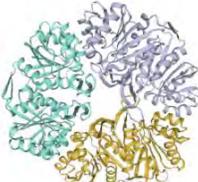
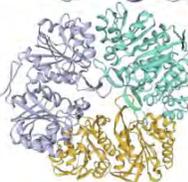
Fragmento	Estructura predicha	Templado	Fragmento de referencia
HuGlyI-I			7vq6.1.A Lactoilglutation liasa de <i>Gossypium hirsutum</i> (62.26% Identidad)
HuGlyII-I			2q42.1.A Putative hidroxiaclglutation hidrolasa 2 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (76.31% Identidad)
HuGlyDJ-I			4ofw.1.A Proteina homologa DJ-1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (76.94% Identidad)

Figura 50. Modelado 3D de proteínas Glioxalasa. Utilizando la herramienta Swiss Model (Swissmodel.expasy.org)

6.8.3 Diseño *in silico* de oligonucleótidos qPCR para Glioxalosas en *H. undatus*.

A partir de las regiones analizadas se diseñaron oligonucleótidos *in silico* específicos para glioxalosas de *H. undatus* obteniendo los pares reportados en la tabla 16. Se utilizaron como referencia los oligonucleótidos MbGlyI-I, MbGlyII-I, MbGlyII-III y MbGlyDJ-I a partir del transcriptoma de *M. bombycina* (Enríquez- González *et al.* 2021).

Tabla 16. Oligonucleótidos *in silico* para glioxalosas de *H. undatus*.

Glioxalasa	Oligonucleótido	Amplicón	Tm
HuGlyI-I	F 5' AGTGACCCGGTGGATCGTA 3'	115 pb	61 °C
	R 5' GAAGCCACGAGGGTCTGTG 3'		
HuGlyII-I	F 5' AGTGTGTATTGCGGGCATGA 3')	132 pb	60 °C
	R 5' CGTAAATGAGCTACGCGGGA 3'		
HuGlyII-III	F 5' AGCCGACTAGAGTTTATTGT 3'	153 pb	55 °C
	R 5' CAATGGTTGAAGGAATGGT 3'		
HuGlyDJ-I	F 5' TACACGGATACCGAGGAGCG 3'	110 pb	55 °C
	R 5' GGAGCCTGAGCCAATAGACCG 3'		

6.8.4 Análisis de expresión mediante qPCR de glioxalastas de *M. bombycina* y *H. undatus in vitro* tratadas con BvAgNP.

En *M. bombycina* aumentó la expresión de glioxalasa I-I, II-I, II-III y DJ-I en tratamientos con BvAgNP. En tallo se reportó aumento de expresión respecto al control a partir de los 25 mg/L de BvAgNP, incrementando gradualmente a los 50 y 100 mg/L de BvAgNP para los genes *Gly I-I* y *DJ-I*, para *Gly II-I* se reportó un aumento a los 25 mg/L y posteriormente a los 100 mg/L de BvAgNP, para *Gly II-III* se reportó un aumento en la expresión a los 25 mg/L y nuevamente a los 50 mg/L de BvAgNP. En raíz de *M. bombycina* se reportó aumento de expresión a los 25 mg/L para *Gly I-I*, II-III y *Gly DJ-I*, para *Gly I-I* la expresión volvió a aumentar a los 50 mg/L pero disminuyó a los 100 mg/L, mientras que para *Gly II-III* y *DJ-I* la expresión comenzó a disminuir a partir de los 50 mg/L. Para *Gly II-III* solo se reportó un aumento de expresión a los 50 mg/L de BvAgNP (Figura 51).

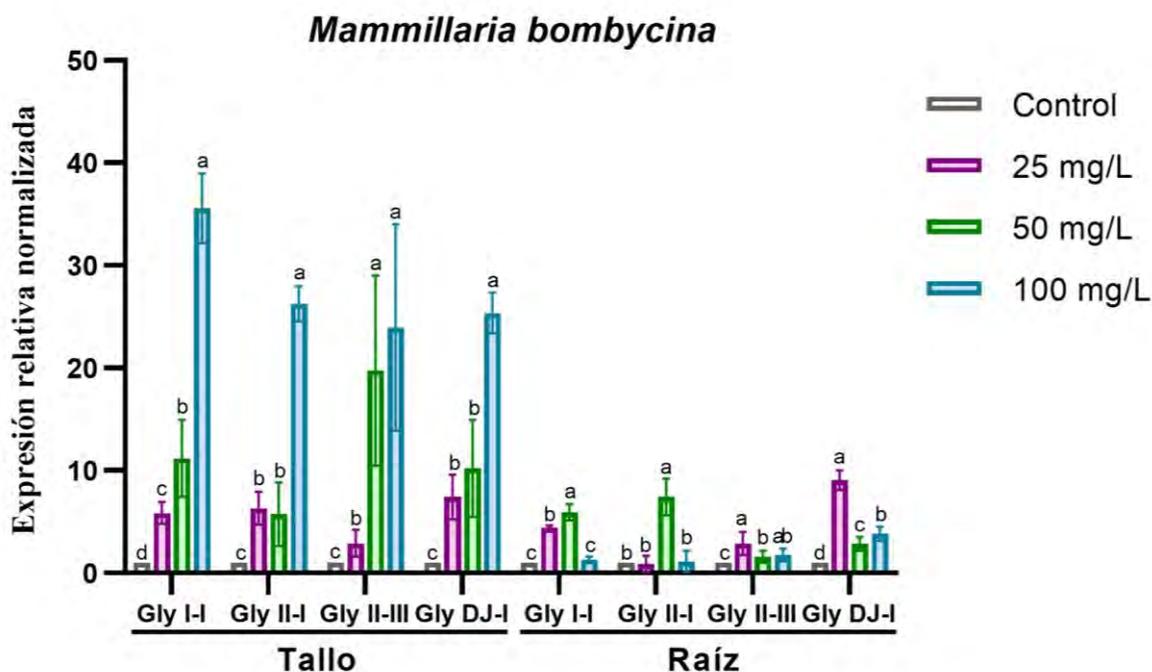


Figura 51. Análisis de expresión de genes glioxalasa en *M. bombycina* con BvAgNP. Se reporta expresión de *Gly I-I*, *Gly II-I*, *Gly II-III* y *Gly DJ-I* en tallo y raíz. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el método de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$). Los valores fueron normalizados previamente mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, las barras representan la desviación estándar.

Por otro lado, en tallo de *H. undatus* la expresión de *Gly I-I* y *DJ-I* disminuyó en tratamientos con *BvAgNP* a partir de los 25 hasta los 100 mg/L respecto al control, para *Gly II-I* la expresión no cambió y para *Gly II-III* se reportó una disminución en la expresión a partir de los 50 mg/L de *BvAgNP*. Por otro lado, en raíz de *H. undatus* la expresión de *Gly I-I*, *II-I*, *II-III*, y *DJ-I* aumentó a los 25 mg/L, tuvo una disminución a los 50 mg/L y volvió a aumentar a los 100 mg/L de *BvAgNP*. (Figura 52).

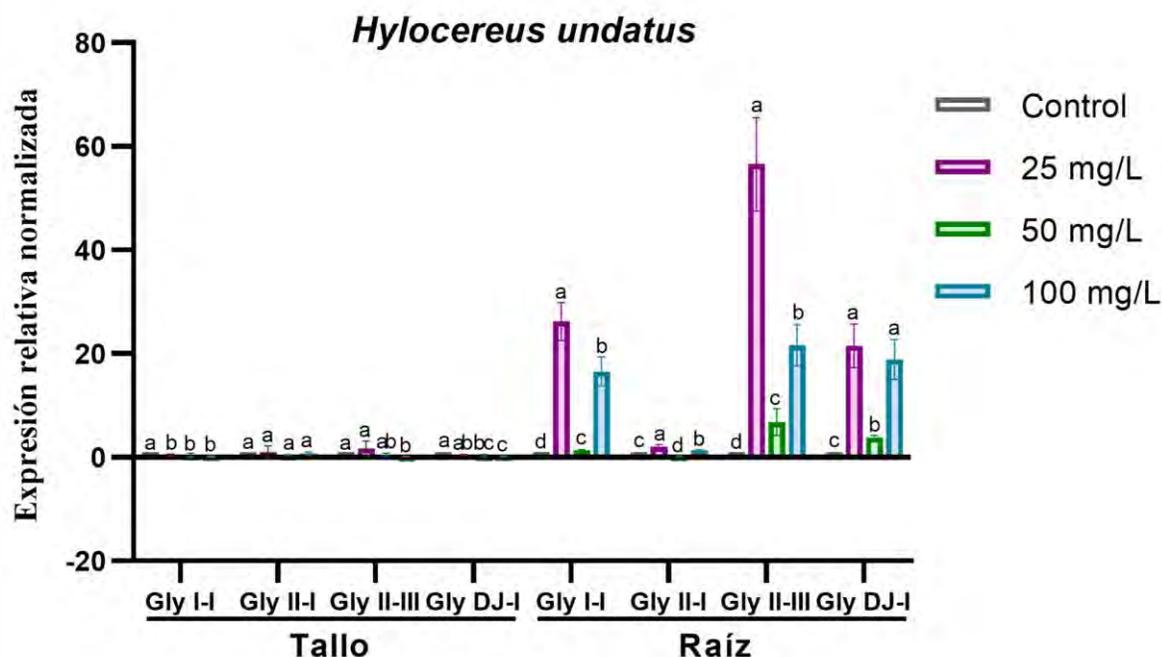


Figura 52. Análisis de expresión de genes glioxalasa en *H. undatus* con *BvAgNP*. Se reporta expresión de *Gly I-I*, *Gly II-I*, *Gly II-III* y *Gly DJ-I* en tallo y raíz. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el método de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$). Los valores fueron normalizados previamente mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, las barras representan la desviación estándar.

7. DISCUSION.

7.1 Péptidos sintéticos antimicrobiano proveniente de glioxalastas de sorgo (*S. bicolor*).

En las últimas décadas el uso de péptidos antimicrobianos se ha popularizado por tener actividad antimicrobiana de alto espectro especialmente contra cepas resistentes a antibióticos, además algunos de ellos son capaces de eliminar biopelículas, regular la respuesta inmune y respuesta inflamatoria (Chaudhary *et al.*, 2024). Los péptidos antimicrobianos se generan a partir de fragmentación de proteínas, PCR o de manera sintética (Quezada-Rivera *et al.*, 2022). Muñoz-Carrillo (2020) sintetizó péptidos antimicrobianos llamados: GSUNION y GSLINK que tienen características hidrosolubles y globulares. En nuestro trabajo se realizó la inducción de proteínas recombinantes en *E. coli* BL21 Rosetta como plataforma de expresión. Tal como lo predijo Muñoz-Carrillo, (2022), GSUNION y GSLINK fueron encontrados en la fracción soluble del extracto de proteínas totales. Las condiciones óptimas de inducción de GSUNION y GSLINK coinciden con Fathi-Roudsari *et al.* (2016) quienes reportan mayor inducción de proteínas recombinantes incubando las cepas transformadas durante 20 h con IPTG 0.1 mM. *E. coli* BL21 Rosetta mejoró la expresión de proteínas eucariotas, suministrando ARNt para codones no encontrados comúnmente en *E. coli*.

En cuanto a la capacidad inhibitoria de los péptidos sintéticos, según la predicción *in silico* de Muñoz-Carrillo (2022), GSUNION y GSLINK tienen prevalencia de aminoácidos con cargas positivas aumentando la posibilidad de ser péptidos funcionales. Dos de los péptidos de glioxalastas de sorgo que conforman GSUNION y GSLINK tienen actividad contra *E. coli* (ATCC 25922) (Gram -) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853) (Gram -) pero ninguno tiene actividad contra *S. aureus* (ATCC 29213) (Gram+) a concentraciones menores de 100 µg/ml (Pirtskhalava *et al.*, 2021). Sin embargo, la única acción inhibitoria encontrada fue utilizando el extracto proteico que contenía el péptido GSLINK probado contra *S. aureus* (ATCC 29213). Los mecanismos de acción de los PAMs dependen de múltiples factores como la carga, interacciones secundarias, la solvatación y composición de aminoácidos e interacciones inespecíficas (Pirtskhalava *et al.*, 2021; Chaudhary *et al.*, 2024). GSLINK al poseer las regiones espaciadoras [(GGGS)]₃ tiene mejor plegamiento de los péptidos que lo conforman facilitando su interacción con las membranas bacterianas (Baghbeheshti *et al.*, 2021), por lo tanto, la actividad contra las cepas probadas coincide con una mayor

actividad antibacteriana que GSUNION. Por otro lado, GSLINK tuvo dos cambios en su estructura secundaria comparado con el diseño inicial, lo cual podría cambiar su eficacia antimicrobiana (Chaudhary *et al.*, 2024). Curiosamente el aminoácido D también es utilizado dentro de regiones espaciadoras de PAMs sin embargo, las regiones con GS son más efectivas para potencializar la actividad de los PAMs (Baghbeheshti *et al.*, 2021) además tiene una carga negativa lo cual afecta a la funcionalidad antimicrobiana general del PAM.

7.2 Aislamiento e identificación de microorganismos contaminantes de *M. bombycina* in vitro.

Existen muchos microorganismos endófitos que no se han podido identificar debido a que no es posible aislarlos de la planta hospedera, ya que dependen de ésta (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2021).

En el cultivo de tejidos vegetales, se ha observado que durante las primeras etapas de propagación las plantas pueden contener endófitos pero son asintomáticas, sin embargo, conforme aumenta la cantidad de veces que la planta es propagada, su edad o el tiempo de cultivo, estos endófitos pueden manifestarse y crecer en el medio de cultivo, generando contaminación (Abdelfattah *et al.*, 2021). Durante el proceso de propagación de *M. bombycina* en el Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, se ha detectado contaminación recurrente por los microorganismos estudiados en el presente trabajo.

El contaminante A que presentaba una coloración negra pudo aislarse en medio MS pH 5.7 25 °C por 15 - 30 días. Con el marcador molecular ITS se identificó como *Spissiomycetes* sp. y fue denominado *Spissiomycetes bomby*. Coincide con la morfología macroscópica de *Spissiomycetes endophytica* (Suwannarach *et al.*, 2018), sin embargo, su secuencia de la región ITS de esta especie no se encuentra reportada hasta ahora en la base de datos. En el dendrograma se observa que *Spissiomycetes bomby*, se agrupa en una sola rama con otras secuencias correspondientes al género *Spissiomycetes*, diferenciándose de el resto de *Dothydeomycetes*. El género *Spissiomycetes* forma parte de los llamados hongos imperfectos de la familia *Dothydeomycetes* (Suwannarach *et al.*, 2018). Sin embargo, también es considerado como parte de un grupo de bacterias con forma cocoide cuyas células se unen entre sí formando estructuras muy parecidas a las hifas de los hongos, lo cual dificulta su identificación y caracterización. Este género ha sido encontrado como organismo endófito y su uso biotecnológico es la producción del pigmento natural

melanina por la especie *S. endophytica* SDBR-CMU319, endófito de *Balanophora fungosa* (Suwannarach *et al.*, 2019). Tal vez con *Spissiomycetes bomby*, se podrían realizar estudios posteriores para la producción de melanina al igual que otras especies de este género.

Los contaminantes B y C encontrados se aislaron en Agar Mueller Hinton pH 6.5, PDA pH 5.6 y PDA a 25 °C por 6 días, además solo el contaminante C tuvo crecimiento en PDA acidificado con ácido láctico, por lo que el contaminante B son microorganismos no tolerantes de pH ácido. Los tres contaminantes seleccionados son de lento crecimiento.

El contaminante B que presentaba una coloración naranja, identificado con la región 16s rRNA como *Mycobacterium* sp., fue denominado *Mycobacterium bomby*. El alineamiento múltiple y el dendrograma muestra únicamente relación con el género *Mycobacterium*, de la familia *Mycobacteriaceae*. Es una mycobacteria escotocromogénica de crecimiento lento que requiere incubación de 3 semanas de 28 – 37 °C para obtener colonias maduras. Algunos autores han encontrado micobacterias asociadas a la rizósfera de plantas como trigo y arroz (Wang *et al.*, 2016). Longoria-Espinoza *et al.* (2020) caracterizaron tres cepas de *Mycobacterium* encontradas en tomate, estas bacterias son encontradas principalmente en raíz, en menor cantidad en tallo y ausentes en semilla. También se ha encontrado en nódulos radiculares, como el caso de *M. frederiksbergensis* encontrado en *Astragalus armatus* (Bouam *et al.*, 2018). Algunas especies de *Mycobacterium* son endófitos de raíces y promueven el crecimiento de la planta y algunas otras participan en la biodegradación de hidrocarburos (Bouam *et al.*, 2018).

El contaminante C presentaba una coloración rosa y características morfológicas típicas del género *Methylobacterium* (Kovaleva *et al.*, 2014). Fue identificado con la región 16s rRNA como *Methylobacterium* sp., fue denominado como *Methylobacterium bomby*. El género *Methylobacterium* cuenta con más de 50 especies, de las cuales no se encontraron todas las secuencias reportadas de la región 16S rRNA en la base de datos. La secuencia obtenida reportó un 97.85 % de identidad con *M. phyllosphaerae* (MN629083.1), *M. fugisawaense* (MN629052.1) y *M. orizae* (MK318598.1). En el dendrograma también muestra relación con secuencias de la familia *Methylobacteriaceae*. sin embargo, de todos los géneros de esta familia incluidos en el análisis, *Methylobacterium bomby* se agrupó en la rama del género *Methylobacterium*. Al igual que las mycobacterias, las methylobacterias son de lento crecimiento, tardando al menos 7 días en desarrollarse a temperaturas de 25

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a 30 °C por lo que es difícil detectarlas durante las primeras semanas posteriores a la propagación de tejidos vegetales *in vitro*, además porque su temperatura óptima de desarrollo es mayor que la utilizada en la incubación de tejidos vegetales de 25 °C. Se ha reportado que algunas especies de *Methylobacterium* forman parte de la microbiota endófito de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Longoria-Espinoza *et al.*, 2020). Salas-Limón (2020) aisló 13 cepas pertenecientes a *Methylobacterium* a partir de cactus del género *Cylindropuntia*.

En cuanto al análisis de resistencia a antibióticos de *Mycobacterium bomby* y *Methylobacterium bomby*, se observó que *Mycobacterium bomby* es resistente a todos los estándares de antibióticos para Gram positivos probados. Esta es una característica de las micobacterias, lo que las hace muy peligrosas ya que muchas de ellas son patógenas o patógenas oportunistas, y son muy difíciles de controlar, siendo la principal *Mycobacterium tuberculosis* (Gerasimova *et al.*, 2021). Las micobacterias han mostrado sensibilidad a la rifampicina, rifabutina, isoniazida, azitromicina y claritromicina (Henkle & Winthrop, 2015), coincidiendo con lo mostrado en el presente trabajo donde se vió inhibición de *Mycobacterium bomby* con rifampicina. Para *Methylobacterium bomby* se reportó resistencia para la mayoría de los estándares de antibióticos para Gram negativos probados, excepto para amikacina, concordando con otros estudios donde se ha visto que las *Methylobacterium* tiene sensibilidad a amikacina, gentamicina, ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol y de manera variable a antibióticos β -lactámicos (Kovaleva *et al.*, 2014), por lo que en el presente trabajo se utilizó amikacina como control en las pruebas de inhibición.

7.3 Huella génica de *Mycobacterium bomby* y *Methylobacterium bomby*.

La huella génica mediante REP-PCR de *Methylobacterium bomby* y *Mycobacterium bomby* mostró bandeos característicos. Lo cual facilita la identificación y/o diferenciación de *Methylobacterium bomby* y *Mycobacterium bomby* durante los primeros días de crecimiento bacteriano sobre cultivos de *M. bombycina in vitro*, y así dar pronto y oportuno tratamiento antibacteriano, ya que los pigmentos rosa y naranja característicos de ambas bacterias comienzan a ser notorios aproximadamente a los 15 o 30 días de la aparición de las colonias sobre el medio MS. Salas-Limón (2020) realizó un análisis de bandeos por BOX PCR utilizando también el oligonucleótido BOX AIR en cepas de *Methylobacterium* aisladas de la cactácea *Cylindropuntia* spp., obteniendo perfiles de bandeos complejos y una amplia

diversidad genómica por la baja similitud en la huella génica de las diferentes especies. Los bandeos obtenidos en el presente trabajo muestran similitud a *M. radiotolerans* reportados por Salas-Limón (2020).

7.4 Adaptación en suelo de *M. bombycina* in vitro inoculada con *Methylobacterium bomby*.

Las bacterias *Methylobacterium* tienen la capacidad de asociarse por simbiosis con algunas plantas, donde la planta produce metanol que toma la bacteria como fuente de carbono y energía, mientras que la bacteria libera sustancias necesarias para la planta como hormonas auxinas y citoquininas, regula la producción de etileno y ayuda a la generación de una resistencia sistémica contra algunos patógenos (Raja *et al.*, 2008). Por esto son consideradas bacterias promotoras de crecimiento, además participan en la fijación del nitrógeno atmosférico (Abanda-Nkpwatt *et al.*, 2006).

Debido a la especificidad de relación que tienen algunos microorganismos con sus plantas hospederas, se probó el efecto de *Methylobacterium bomby* aislada en este trabajo en plántulas de *M. bombycina* in vitro como propuesta para mejorar su proceso de aclimatación. Después de un periodo de aclimatación y cultivo de 180 días, las plántulas inoculadas con la bacteria tuvieron apariencia más vigorosa y un mayor diámetro de tallo que las plantas control. En otros estudios con las especies *M. mesophilicum* y *M. radiotolerans* se reportan endófitas del xilema del olivo, las cuales además de funcionar como promotoras de crecimiento, ayudan al control de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (Antelmi *et al.*, 2019). La cepa de *Methylobacterium extorquens* ME4 aislada de fresa (*Fragaria x ananassa* cv. Elsanta) aumentó el peso y longitud de brotes de plantas como *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum*, *Sinapis alba* y *F. vesca* pero no de otras plantas también probadas (Abanda-Nkpwatt *et al.*, 2006).

Methylobacterium bomby, también fue probada en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.) y mezquite (*Prosopis juliflora*) con el fin de ver su efecto en el crecimiento y desarrollo. Sin embargo, no se observaron efectos significativos (resultados no mostrados), lo cual demuestra que este endófito puede ser exclusivo de *Mamillaria bombycina* o de algunas cactáceas, resultados parecidos a los reportados por Abanda-Nkpwatt *et al.*, (2006).

7.5 Evaluación de la capacidad antimicrobiana de BvAgNP.

Uno de los principales problemas del cultivo de tejidos vegetales es la contaminación por microorganismos. Debido a esto se han probado varios antibióticos que han sido favorables contra algunos contaminantes, pero la mayoría de estos antibióticos con el paso del tiempo producen resistencia en los microorganismos o afectan también a la planta (Sahakyan *et al.*, 2019). Como una alternativa está el uso de nanopartículas que se ha visto tienen efecto bactericida y fungicida y además pueden funcionar como estimuladores del crecimiento vegetal (Esquivel-Figueredo & Mas-Diego, 2021).

En este trabajo se utilizaron BvAgNP para inhibir el crecimiento de *Aspergillus sp.*, *Colletotrichum sp.* y *Cladosporium sp.* El efecto de BvAgNP a concentraciones de 25, 50 y 100 mg/L no tuvo inhibición a los 30 min y 1 h de exposición sin embargo se alcanzó un 100% para *Aspergillus sp.*, *Colletotrichum sp.* y un 12.29 % para *Cladosporium sp.* a partir de las 3 h de exposición. Este efecto de las BvAgNP posiblemente se deba a que al entrar en contacto directo con las esporas y tubos germinativos de los hongos, interfieran en su formación y disminuyan su viabilidad. Además, al estar en solución acuosa (Buffer de fosfatos), se liberan iones plata que son ácidos débiles y reaccionan con bases débiles como el azufre y el fósforo presentes en las células, produciendo un daño o muerte celular (Young-Ki & Byung, 2009).

En las pruebas contra los microorganismos identificados, el método de desinfección de tejidos inoculados y conteo de UFC de extractos endófitos, para *M. bombycina*, el mejor tratamiento antimicrobiano fue con NaClO 0.5%, a diferencia de la aplicación de BvAgNP en el medio de cultivo, que favoreció la acumulación de *Mycobacterium sp.* en *M. bombycina* crecida en MS con 50 o 100 mg/L de BvAgNP. Sin embargo, el NaClO es más agresivo para la planta y aumenta el riesgo a la muerte del explante o su hiperhidratación, ya que este agente puede ser fitotóxico a altas concentraciones dependiendo la especie (Borges García *et al.*, 2009). Con estos tratamientos no puede saberse aun si los tratamientos funcionan eliminando los microorganismos o solo inhibiendo su crecimiento, para esto es necesario realizar más pruebas, debido a que los contaminantes seleccionados pueden tratarse de microorganismos endófitos, estar latentes y expresarse bajo ciertas condiciones (Leifert & Cassells, 2001), haciendo más difícil su eliminación y además alterando la interpretación de los resultados.

Comparando, el método de exposición directa células bacterianas contra diferentes concentraciones de BvAgNP tuvo mejor efecto antimicrobiano contra *Methylobacterium* sp. y *Spissiomycetes* sp. Por el contrario, *Mycobacterium* sp. mostró mayor resistencia contra BvAgNP. Debido a la alta sensibilidad que mostró *Methylobacterium* sp. a las BvAgNP, se probaron dos concentraciones intermedias de 12.5 y 75 mg/L para poder apreciar mejor la tendencia del efecto inhibitorio (Figura 24), encontrando una concentración óptima de 12.5 mg/L con 15 min de exposición.

El mecanismo de acción de las AgNP contra microorganismos depende de sus características físicas, como tamaño, forma, recubrimiento, carga superficial, etc. En este caso, las BvAgNP presentan forma esférica de 78 nm de diámetro con 39.76 % plata (Garcidueñas-Piña *et al.*, 2023), sin embargo, debe considerarse que las BvAgNP pueden aglomerarse aumentando sus dimensiones. Además, se encuentran recubiertas con extractos vegetales de acelga, lo que puede aumentar el reconocimiento por las células de los organismos con los que interactúan, de esta forma, podrían unirse a membranas y modificar su permeabilidad alterando el funcionamiento celular, o incluso podrían penetrar en la célula e interferir en mecanismos como respiración, división o muerte celular (Prabhu & Poulouse, 2012).

7.6 Evaluación del efecto de BvAgNP en el crecimiento y desarrollo *M. bombycina* y *H. undatus* in vitro.

Las AgNP tienen alto potencial como reguladores en el crecimiento y desarrollo de plantas, pues además de producir, bajo ciertas condiciones, efectos positivos en muchas especies vegetales, también tienen efecto bactericida y fungicida conocido (Bruna *et al.*, 2021). Sin embargo, debe tomarse en cuenta que para algunas especies y con algunas AgNP pueden existir efectos negativos.

Para justificar la aplicación de las BvAgNP en tratamientos prolongados sobre MS sólido, se comparan nuestros resultados con lo reportado por Chávez-García *et al.*, (2020) quienes utilizaron MS sólido adicionado con 25, 50, 100 y 200 mg/L de AgNP en tratamientos de 45 días de cultivo, mientras que Pastelin- Solano *et al.*, (2020) lo utilizaron con las mismas características hasta 60 días de cultivo. Estos estudios de cultivos por periodos prolongados indican que es posible aplicar las BvAgNP en cultivo *in vitro* de cactáceas, ya que son plantas de lento desarrollo, en el presente trabajo fue necesario incubarlo por 90 días para poder apreciar el efecto de los tratamientos.

Al probar altas concentraciones de *BvAgNP* (100, 200, 500 y 1000 mg/L) en *H. undatus in vitro*, se detectaron alteraciones en el enraizamiento y brotación, con 1000 mg/L se observó la producción de raíces atípicas aparentemente aéreas, gruesas y de color amarillo, lo cual podría ser una respuesta de la planta ante el estrés producido por la presencia de plata (Milewska-Hendel *et al.*, 2019).

El análisis MEB de explantes tratados con 1000 mg/L *BvAgNP* se realizó con la intención de observar el daño que producían las *BvAgNP* a altas concentraciones en *H. undatus in vitro*, dicho daño puede apreciarse claramente en la raíz (Figura 30) donde se aprecia la formación de múltiples fibras en la zona externa y en las células de raíz y tallo (Tabla 13) las cuales acumularon altas concentraciones de cristales salinos, en las zonas externas de raíz y tallo si se encontraron *BvAgNP*, sin embargo, no se tienen pruebas suficientes para comprobar la acumulación de *BvAgNP* en el interior de los tejidos, para decir que el efecto tóxico fue producido por el efecto de las nanopartículas o solo de los iones plata que desprenden.

En las fotografías por MEB no es posible asegurar la presencia de *BvAgNP*, pueden verse gran cantidad de vacuolas o cristales salinos acumulados tanto en el exterior del tallo como en el interior de raíz, sin embargo, en algunas zonas de raíz y de tallo donde se observaron partículas parecidas a *BvAgNP*, con el análisis de elementos se comprobó la presencia de una pequeña cantidad de plata. En las muestras tratadas con 1000 mg/L de *BvAgNP* del exterior de tallo si se detecta presencia de plata, así como en el análisis del interior de raíz. En algunas muestras de tallo, aparecen otros componentes como Sodio (Na) y Magnesio (Mg) debido a que el medio MS los contiene, sin embargo, en las muestras de raíz estos elementos no aparecen, comprobando que las raíces no tuvieron contacto con el medio y por lo tanto la muestra no tenía residuos de este, así que la plata presente en el análisis proviene de la acumulada por la planta en raíz.

Debido a lo anterior, se seleccionó como concentración máxima 100 mg/L de *BvAgNP* para los posteriores análisis en *M. bombycina* y *H. undatus in vitro*, debido a que esta fue la concentración donde se detecta menor respuesta tóxica en los explantes.

Para *M. bombycina* los tratamientos con *BvAgNP* no produjeron respuestas favorecedoras para la planta, afectando el enraizamiento. Mirmoeini *et al.* (2021) reportan que concentraciones de 2 g/L de AgNP no ejercen cambios en la altura de *Camelina sativa* L pero concentraciones mayores ejercen una disminución en su crecimiento. Otro efecto

detectado fue la producción de callo, lo que podría ser poco deseable según el objetivo del cultivo *in vitro*, sin embargo, podría aplicarse para el cultivo de callos. Es importante considerar que no se detectó contaminación en los explantes tratados con BvAgNP, a diferencia del control, lo que concuerda con la capacidad antimicrobiana de las BvAgNP. Según lo descrito, para el caso de *M. bombycina in vitro*, el uso de BvAgNP a 25, 50 y 100 mg/L en el medio de cultivo no es recomendable, ya que si actúa como antimicrobiano, pero afecta el enraizamiento de la planta. Posiblemente la planta detectó la presencia de BvAgNP como un factor estresante, y detuvo su crecimiento y enraizamiento como método de defensa.

En cambio, para *H. undatus* los tratamientos con BvAgNP favorecieron la brotación y el enraizamiento. Estos resultados son similares a los reportados por Garcidueñas-Piña *et al.* (2023), quienes reportan aumento en la longitud de plantas de *A. thaliana* germinadas en medio adicionado con 0.01 mg/mL de BvAgNP, sin embargo, a 10 mg/mL reportan disminución en la longitud de las plantas. Por otro lado, Chávez-García *et al.* (2020) utilizaron concentraciones de 50 mg/L de AgNP en ápices de gladiolo generando una longitud del brote 35.5 % mayor que el control sin AgNP, además de un alto porcentaje de asepsia (91.67 %). Esta misma concentración fue considerada óptima por Spinoso (2016), para la regeneración *in vitro* de *V. planifolia*, siendo suficiente para eliminar contaminación bacteriana aumentando significativamente el crecimiento a las plántulas, lo cual no se conseguía al aumentar la concentración a 100 mg/L. En 2020, Pastelín-Solano *et al.* prueban un sistema parecido a Spinoso, 2016 con tratamientos de AgNP en medio MS sólido obteniendo el menor porcentaje de contaminación a 100 mg/L de AgNP y a concentraciones de 25 y 50 mg/L mayor multiplicación y elongación del vástago y formación y elongación de hojas. Sichanova *et al.* (2022) reportaron promoción de crecimiento de *S. rebaudiana in vitro* con medios adicionados con nanofibras de plata hasta 50 mg/L, e inhibición de crecimiento a 100 mg/L. Lo anterior concuerda con los datos obtenidos en el presente trabajo para *H. undatus in vitro*, donde se favorece la brotación y el enraizamiento con 25 mg/L de BvAgNP. Los resultados obtenidos en el análisis morfológico concuerdan con Vannini *et al.* (2013), quienes compararon la aplicación de AgNP de 10 nm y Ag + en forma de AgNO₃, en *Eruca sativa* notando para ambos casos mayor efecto en raíces que en brotes, debido a la poca translocación de plata de raíces a brotes. Las raíces tratadas con BvAgNP desarrollaron engrosamiento y tinción rojiza a partir de la zona de elongación hasta la zona apical de la raíz. Las alteraciones producidas por AgNP en el sistema radicular

de la planta puede limitar la absorción de agua y nutrientes del medio, afectando directamente el desarrollo de la planta (Milewska-Hendel *et al.*, 2019).

Queda claro que a pesar de pertenecer ambas especies analizadas a la familia cactaceae, subfamilia cactoideae, responden de forma muy diferente en presencia de BvAgNP. El tallo de *M. bombycina* puede llegar a medir 20 cm de longitud (Hernández-Camacho *et al.*, 2017), mientras que los tallos de *H. undatus* pueden alcanzar los 5 m de longitud. Es posible que esta diferencia de talla entre ambas especies influya en su respuesta ante el cambio de concentración de nutrientes disponibles en el medio ocasionado por las BvAgNP.

Los diferentes efectos de las BvAgNP en la brotación podrían explicarse mediante diversos mecanismos. Podrían estar actuando dentro de las células como nanopartículas o disolverse en la superficie de la raíz liberando iones plata (Ag^+), los cuales tendrían un efecto en las reacciones de óxido reducción del medio de cultivo y además podrían ser absorbidos por la raíz de la planta (Jiang *et al.*, 2012) desencadenando una serie de respuestas metabólicas. En el primer caso, los iones Ag^+ interactúan con los iones negativos en solución del medio MS, como el ion fosfato, reduciendo su disponibilidad como nutrientes para las raíces. La ausencia de fósforo disponible en el medio ocasiona, en algunas especies vegetales, la producción de mayor cantidad o longitud de raíces como proceso adaptativo para buscar el nutriente, lo que podría explicar el aumento en el enraizamiento de *H. undatus* en presencia de BvAgNP. En el segundo caso, los iones Ag^+ al estar en contacto con las células vegetales pueden ocasionar: estrés oxidativo, al interactuar con enzimas de la cadena respiratoria como la NADH deshidrogenasa y generar radicales libres; alteraciones en la homeostasis celular, al unirse a los grupos tiol de los residuos de cisteína de las proteínas de transporte de protones; mutaciones en el ADN; ruptura de la función mitocondrial, al dañar a los lípidos de membrana por la acumulación de ROS (Jiravova *et al.*, 2016). El aumento del estrés oxidativo ocasionado por la acumulación de Ag afecta al crecimiento y desarrollo vegetal (Tripathi *et al.*, 2017). Además, las AgNP disminuyen la capacidad de absorción de macro y microelementos por las plantas, alterando su homeostasis iónica y por lo tanto afectando a su crecimiento (Zare *et al.*, 2020).

El nivel de estrés producido por las BvAgNP se comprobó por la cantidad de vacuolas formadas por las células vegetales, lo que indica la acumulación de compuestos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tóxicos y iones metálicos en la planta. En tallo de *M. bombycina* y *H. undatus* se detectó el mismo efecto, mostrando un aumento en la cantidad de vacuolas a partir de los 25 mg/L de *BvAgNP*, siendo significativo el aumento con respecto al control hasta los 50 mg/L. Ambas especies cactáceas producen acumulación de vacuolas en presencia de *BvAgNP*, este resultado concuerda con lo reportado por Vannini *et al.* (2013) quienes reportan acumulación de vacuolas en células de la punta de la raíz tratada con *AgNP*. También Mirmoeini *et al.* (2021) reportan acumulación de plata en tallo y raíz en *C. sativa* L tratada con *AgNP*, obteniendo mayor concentración acumulada en raíz. Otra característica observable en el análisis micromorfológico fue la aparente disminución del diámetro de la epidermis de la raíz de ambas especies, (Figura 40 y 41) sin embargo, sería necesario realizar más estudios para comprobar que este efecto es debido a la presencia de *BvAgNP* o a la diferencia de edad de los brotes *in vitro* analizados. El efecto de *BvAgNP* sobre las células vegetales depende de las características de las *BvAgNP*, la concentración aplicada, el tiempo de exposición del tratamiento, de la especie vegetal y de la edad de la planta tratada (Vannini *et al.*, 2013; Jirovova *et al.*, 2016).

En el análisis MEB se encontraron zonas del tejido de tallo y raíz de las dos especies vegetales analizadas con daño sobre la membrana celular principalmente en tratamiento con 100 mg/L de *BvAgNP* (Figura 42 y 43), el cual no pertenecía a los daños producidos durante el corte en parafina. Puede apreciarse la acumulación de cristales dentro de las células conforme aumenta la concentración de *BvAgNP*. Un estudio similar fue realizado por Lin y Xing (2008) quienes reportan la translocación de nanopartículas de óxido de zinc en la endodermis de las células de *Lolium perenne* L. (ryegrass), ocasionando daño en raíz e inhibición de crecimiento.

En el análisis de elementos por EDS se realizó en zonas de tallo y raíz con sospecha de presencia de plata proveniente de *BvAgNP*, teniendo en cuenta que el medio MS basal no contenía plata en su formulación. Los puntos de muestreo se distribuyeron entre el sistema vascular y células con acumulación de cristales. En las fotografías por MEB se revela la ausencia de *BvAgNP* acumuladas dentro de las células vegetales (Figura 42 y 43), por lo cual la plata encontrada en el análisis de elementos EDS (Figura 44) proviene de *Ag* + liberados de las *BvAgNP* en solución (Jirovova *et al.*, 2016) y debido a la interacción con la gran cantidad de iones en solución del medio MS. Concordando con Vannini *et al.* (2013)

quienes reportan que sus resultados obtenidos en la elongación de raíz de *E. sativa* estaban mediados por Ag + liberados de las AgNP aplicadas.

7.7 Análisis de la microbiota asociada a cultivos *in vitro* de *M. bombycina* y *H. undatus* tratados con BvAgNP.

A pesar de tratarse de cultivos *in vitro* que se espera sean establecidos y propagados bajo condiciones axénicas, tanto *M. bombycina* como *H. undatus* mostraron un alto contenido de microorganismos en los tres medios de cultivo utilizados enriquecidos para el crecimiento de hongos bacterias y levaduras.

El establecimiento *in vitro* de algunas cactáceas no es a partir de semilla, si no a partir de meristemas apicales o por fragmentos radicales o de tejido. Por lo que es más probable de contener endófitos como el caso de las micobacterias o methylobacterias haciendo más difícil de eliminar la microbiota endófito durante el establecimiento. En el caso de las cactáceas utilizadas, su establecimiento fue a partir de germinación de semillas en condiciones axénicas y posterior activación de areolas (Retes-Pruneda *et al.*, 2007). Sin embargo, algunas de las cactáceas del banco de germoplasma vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, fueron establecidas *in vitro* a partir de tallos, por lo que es posible que contuvieran algunos contaminantes altamente resistentes que se han transmitido de uno a otro cultivo.

Según el análisis de microbiota, *M. bombycina* presentó mayor concentración microbiana en raíz, los tratamientos con BvAgNP disminuyeron dicha concentración a partir de 25 o 50 mg/L. En general, *H. undatus* tuvo menor concentración microbiana que *M. bombycina*. Los tratamientos con BvAgNP a 25 mg/L disminuyeron la carga microbiana de tallo y raíz de *H. undatus*, sin embargo, a partir de los 25 y 50 mg/L aumentó nuevamente. Este efecto puede deberse a que el recubrimiento orgánico de las BvAgNP esté funcionando como nutriente adicional en el medio de cultivo para los microorganismos, además la planta se encuentra debilitada por el proceso de intoxicación en presencia de AgNP. Algunos estudios reportan que las AgNP tienen efecto en las comunidades bacterianas de la rizosfera, donde AgNP de entre 30 y 60 nm con carga negativa permiten la proliferación de bacterias benéficas como las fijadoras de nitrógeno, mientras que las AgNP de carga negativa beneficiaban el desarrollo de microorganismos anaeróbios y autótrofos, perjudicando así el desarrollo de las plantas asociadas (Wojciech Przemieniecki *et al.*, 2024).

7.8 Análisis de expresión mediante qPCR de glioxalasa de *M. bombycina* y *H. undatus* tratadas con BvAgNP.

El sistema de enzimas glioxalosas está relacionado a la defensa de las plantas ante el estrés oxidativo por metales, ya que el MG es producido en exceso durante la glucólisis bajo este tipo de estrés (Kaya *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2021) además se ha comprobado que las AgNP producen daño oxidativo (Vannini *et al.*, 2013). El análisis de expresión de los genes glioxalosas muestran perfiles de expresión diferentes entre tallo y raíz de *M. bombycina* y tallo y raíz de *H. undatus*. Ambas especies reaccionan de forma diferente ante la presencia de plata. Sin embargo, las dos rutas del sistema glioxalasa fueron reguladas por la presencia de BvAgNP, la mediada por las Gly I y Gly II y la mediada por Gly III (Figura 51 y 52). Otros autores concuerdan que el comportamiento de expresión de los genes glioxalasa depende de la planta, el tejido y el tipo de estrés analizado (Jana *et al.*, 2021; Enríquez-González *et al.*, 2022). En *M. bombycina* se aumenta la expresión de los genes glioxalasa en tallo y raíz a partir de los 25 mg/L de BvAgNP (Figura 51), los tratamientos aplicados fueron poco favorables para la especie según todas sus respuestas. Para *H. undatus* disminuye la expresión de los genes glioxalasa en tallo, sin embargo, su expresión aumenta en raíz a partir de los 25 mg/L de BvAgNP. Debe considerarse que la respuesta en el enraizamiento de las plantas tuvo variaciones entre réplicas, por lo que las raíces analizadas para el tratamiento de 100 mg/L de BvAgNP de ambas especies corresponden solo a individuos que toleraron mejor el estrés y si produjeron raíz (Figura 34). Mirmoeini *et al.* (2021) reportan aumento de la actividad enzimática de Gly I y Gly II a partir de 1 g/L de AgNP, sin embargo, la actividad disminuye en las concentraciones más bajas y altas probadas, discutiendo una posible biometabolización insuficiente de MG a altas concentraciones de AgNP. Los genes glioxalasa están relacionados a una compleja red de respuesta ante estímulos estresantes de tipo biótico como abiótico, por lo que sus perfiles de expresión podrían estar influenciados por el estrés oxidativo producido por los Ag⁺ en contacto con la raíz, la expresión del gen glioxalasa *DJ-I* puede ayudar a mantener los niveles de MG y disminuir el estrés oxidativo, concordando con Yadu *et al.* (2018). Por lo tanto, el aumento en el enraizamiento es una manera en la que *H. undatus* resiste el estrés producido por la falta de nutrientes y la presencia de Ag⁺.

8. CONCLUSIONES.

Los péptidos sintéticos GSUNION y GSLINK diseñados a partir de glioxalasa de *S. bicolor* fueron expresados en *E. coli*. Solo el extracto proteico que contenía a GSLINK tuvo actividad antimicrobiana contra *S. aureus*.

Se identificaron tres microorganismos en cultivos *in vitro* de *M. bombycina*, los cuales fueron denominados como: *Spissiomycetes bomby*, *Mycobacterium bomby* y *Methylobacterium bomby*.

Las BvAgNP tienen actividad antifúngica contra *Aspergillus* sp. y *Colletotrichum* sp., y *Cladosporium* sp. Además, BvAgNP tienen capacidad inhibitoria de *Methylobacterium bomby* en tratamientos por contacto directo con la bacteria.

Las BvAgNP ejercen un efecto diferente en el crecimiento y desarrollo entre *M. bombycina* y *H. undatus*. En *M. bombycina* afectan al enraizamiento y en *H. undatus* promueven la elongación de raíces.

BvAgNP produce cambios en la microbiota de tallo y raíz de cultivos *in vitro* de *M. bombycina* y *H. undatus*.

Las BvAgNP alteran la expresión de genes del sistema glioxalasa; la expresión de *Gly I-I*, *II-I*, *II-III* y *DJ-I* en tallo y raíz de *M. bombycina* aumentó a partir de los 25 mg/L, mientras que en *H. undatus* disminuyó en tallo a partir de los 25 mg/L y a aumentó en raíz a los 25 y 100 mg/L.

9. BIBLIOGRAFIA.

- Abanda-Nkpwatt D., Müsch M., Tschiersch J., Boettner M. & Schwab W. (2006) Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J Exp Bot* 57(15):4025-32. doi:10.1093/jxb/erl173.
- Abdelfattah A., Wisniewski M., Schena L. & Tack A.J.M. (2021) Experimental evidence of microbial inheritance in plants and transmission routes from seed to phyllosphere and root. *Environ Microbiol* 23: 2199-2214. doi:10.1111/1462-2920.15392
- Abràmoff M.D., Magalhães P.J., & Ram S.J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* 11(7): 36–42.
- Aebi H. (1984). Catalase *in vitro*. *En: Meth. Enzymol* 105, 121–126.
- Antelmi I., Sion V., Lucchese P.G., Labarile R., & Nigro F. (2019) *Methylobacterium* spp., endophytes of olive trees, as potential biocontrol agents of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. *European Conference on Xylella Fastidiosa*.
- Anwar N., Wahid J., Uddin J., Khan A., Shah M., Shah S. A. Subhan F., Khan M. A., Ali K., Rauf M., & Arif M. (2021) Phytosynthesis of poly (ethylene glycol) methacrylate-hybridized gold nanoparticles from *C. tuberculata*: their structural characterization and potential for *in vitro* growth in banana. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 57(2), 248–260. doi:10.1007/s11627-020-10150-4
- Baghbeheshti S., Hadadian S., Eidi A., Pishkar L. & Rahimi H. (2021) Effect of Flexible and Rigid Linkers on Biological Activity of Recombinant Tetramer Variants of S3 Antimicrobial Peptide. *Int J Pept Res Ther* 27, 457–462. doi:10.1007/s10989-020-10095-7
- Birnboim H.C. & Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7(6): 1513–1523. doi:10.1093/nar/7.6.1513
- Blum M., Chang H.Y., Chuguransky S., Grego T., Kandasaamy S., Mitchell A., Nuka G., Paysan-Lafosse T., Qureshi M., Raj S., Richardson L, Salazar J.A., Williams L., Bork P., Bridge A., Gough J., Haft D.H., Letunic I., Marchler-Bauer A., Mi H., Natale D.A., Necci M., Orengo C.A., Pandurangan A.P., Rivoire C., Sigrist C.J.A., Sillitoe I., Thanki N., Thomas P.D., Tosatto S.C.E., Wu C.H., Bateman A., Finn R.D. (2020) The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, gkaa977
- Borges García, M., Estrada Abeal E. E., Pérez Rodríguez I., Menesses Rodríguez S. (2009) Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata*. L. clon caraqueño. *Rev. Colomb. Biotecnol* 11 (2):127-135.
- Bouam A., Armstrong N., Lévasseur A. & Drancourt M. (2018) *Mycobacterium terramassiliense*, *Mycobacterium rhizamassiliense* and *Mycobacterium numidiomassiliense* sp. nov., three new *Mycobacterium simiae* complex species cultured from plant roots. *Sci Rep* 18;8(1):9309. doi:10.1038/s41598-018-27629-1.

- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7;72:248-54. doi:10.1006/abio.1976.9999.
- Bruna T., Maldonado-Bravo F., Jara P., & Caro N. (2021) Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *International Journal of Molecular Sciences* 22(13) 7202. doi: 10.3390/IJMS22137202.
- Chaudhary S., Ali Z. & Mahfouz M. (2024) Molecular farming for sustainable production of clinical-grade antimicrobial peptides. *Plant Biotechnol.* doi:10.1111/pbi.14344
- Chávez-García J.A., Andrade-Rodríguez M.A., Bello-Bello J.J., Rueda-Barrientos M.C., Guillén-Sánchez D., & Sainz-Aispuro M. de J. (2020) Silver nanoparticles in the *in vitro* establishment of gladiolus apices. *Rev Fitotec Mex* 43(4): 557–567.
- Chen J., Xie F., Cui Y., Chen C., Lu W., Hu X., Hua Q., Zhao J., Wu Z., Gao D., Zhang Z., Jiang W., Sun Q., Hu G. & Qin Y. (2021) A chromosome-scale genome sequence of pitaya (*Hylocereus undatus*) provides novel insights into the genome evolution and regulation of betalain biosynthesis. *Hortic Res* 8(1). doi:10.1038/S41438-021-00612-0/42043679/41438_2021_ARTICLE_612.PDF.
- Chen Z. Y., Brown R. L., Damann K. E., & Cleveland T. E. (2004) Identification of a Maize Kernel Stress-Related Protein and Its Effect on Aflatoxin Accumulation. *Phytopathology* 94(9): 938–945.
- Cheng Y.T., Zhang L., & He S.Y. (2019) Plant-Microbe Interactions Facing Environmental Challenge. *Cell Host Microbe* 14;26(2):183-192. doi:10.1016/j.chom.2019.07.009.
- Cho H.J., Hong S.W., Kim H.J., & Kwak Y.S. (2016) Development of a Multiplex PCR Method to Detect Fungal Pathogens for Quarantine on Exported Cacti. *The plant pathology journal* 32(1), 53–57. doi:10.5423/PPJ.NT.09.2015.0184
- Enríquez-González C., Garcidueñas-Piña C., Castellanos-Hernández O.A., Enríquez-Aranda S., Loera-Muro A., Ocampo G., Pérez-Molphe Balch E., Morales-Domínguez J.F. (2022) De Novo Transcriptome of *Mammillaria bombycina* (Cactaceae) under *In Vitro* Conditions and Identification of Glyoxalase Genes. *Plants (Basel)* 11(3):399. doi:10.3390/plants11030399.
- Esquivel-Figueroa R.C. & Mas-Diego S.M. (2021) Biological synthesis of silver nanoparticles: review of potential use of *Trichoderma* species. *Revista Cubana de Química* 33(2): 211–233.
- Fathi-Roudsari M., Akhavian-Tehrani A., Maghsoudi N. (2016). Comparison of Three *Escherichia coli* Strains in Recombinant Production of Reteplase. *Avicenna J Med Biotechnol* 8(1):16-22.
- Ferreira T. & Rasband W. (2015) ImageJ User Guide/IJ 1.46r. *Bioimage Informatics*.
- Flores-Mancha M.A., Rentería-Moterrubio A.L., & Sánchez-Vega A. (2019) Estructura y estabilidad de las betalainas. *Interciencia* 44 (6): 318 -325.

- Fukatsu T., & Nikoh N. (1998) Two Intracellular Symbiotic Bacteria from the Mulberry Psyllid *Anomoneura mori* (Insecta, Homoptera). *Applied and Environmental Microbiology* 64(10), 3599–3606. doi:10.1128/AEM.64.10.3599-3606.1998
- García-Rubio L.A., Vargas-Ponce O., Ramírez-Mireles F.J., Munguía-Lino G., Corona-Oceguera C.A. & Cruz-Hernández T. (2015) Distribución geográfica de *Hylocereus* (cactaceae) en México. *Botanical Sciences* 93(4): 922.
- Garcidueñas Piña C. (2016) Evaluación de los efectos producidos por materiales nanoestructurados (Ag@TiO₂ y TiO₂ – Cu⁺²) en plantas. [Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Aguascalientes]. México.
- Garcidueñas-Piña C., Tirado-Fuentes C., Ruiz-Pérez J., Valerio-García R.C., and Morales-Domínguez J.F. (2023) Silver Nanoparticles Synthesized with Extracts of Leaves of *Raphanus sativus* L, *Beta vulgaris* L, and *Ocimum basilicum* and Its Application in Seed Disinfection. *Nanomaterials and Nanotechnology* 2023: 1–12 doi:10.1155/2023/9874979.
- Gerasimova E.N., Ismatullin D.D., Lyamin A.V. & Zhestkov A.V. (2021) General characteristics, features of cultivation and antibiotic resistance representatives of *mycobacterium fortuitum* group representatives (review of literature). *Klin Lab Diagn.* 66(4):223-228. doi: 10.51620/0869-2084-2021-66-4-223-228.
- Ghosh A., Kushwaha H. R., Hasan M. R., Pareek A., Sopory S. K., & Singla-Pareek S. L. (2016) Referencias Bibliográficas 62 Presence of unique glyoxalase III proteins in plants indicates the existence of shorter route for methylglyoxal detoxification. *Scientific Reports* 6(1): 18358.
- Guex N., Peitsch M.C., Schwede T. (2009) Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* 30, S162-S173.
- Han J., Zhao S., Ma Z., Gao L., Liu H., Muhammad U., Lu Z., Lv F. & Bie X. (2017) The antibacterial activity and modes of LI-F type antimicrobial peptides against *Bacillus cereus* in vitro. *J. Appl. Microbiol* 123, 602–614.
- Henkle E. & Winthrop K.L. (2015) Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts. *Clin Chest Med.* 36(1):91-9. doi: 10.1016/j.ccm.2014.11.002.
- Hernández-Camacho S. (2016) Aislamiento y caracterización de un gen tipo dehidrina en cactáceas y estudio de su expresión en *Mammillaria bombycina*. [Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Aguascalientes]. México.
- Hernández-Camacho S., Pérez-Molphe-Balch E., Alpuche-Solís A.G., & Morales-Domínguez J.F. (2017) Identification and evolutionary relationships of partial gene sequences from dehydrin group in three species of cacti. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 86: 151–162 1AD. doi:10.32604/PHYTON.2017.86.151.

- Hernández-Díaz M.P. (2013) Síntesis de nanopartículas de plata biológicamente asistida con *Opuntia* sp. Y su incorporación en membranas poliméricas nanofibrosas. (Tesis de Maestría). Centro de investigación en química aplicada. México.
- Islam M.A., Jacob M.V., & Antunes E. (2021) A critical review on silver nanoparticles: From synthesis and applications to its mitigation through low-cost adsorption by biochar. *J Environ Manage* 281: 111918. doi: 10.1016/J.JENVMAN.2020.111918.
- Jiang H.S., Li M., Chang F.Y., Li W. & Yin L.Y. (2012) Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrhiza*. *Environ Toxicol Chem* 31 (8): 1880–1886. doi:10.1002/etc.1899
- Jiménez-García S.N., García-Mier L., Ramírez-Gómez X.S., Aguirre-Becerra H., Escobar-Ortiz A., Contreras-Medina L.M., García-Trejo J.F. & Feregrino-Pérez A.A. (2022) Pitahaya Peel: A By-Product with Great Phytochemical Potential, Biological Activity, and Functional Application. *Molecules* 27(16): 5339.
- Jiravova J., Tomankova K.B., Harvanova M., Malina L., Malohlava J., Luhova L., Panacek A., Manisova B. & Kolarova H. (2016) The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 96: 50–61 doi:10.1016/J.FCT.2016.07.015.
- Kaya C., Ashraf M., Alyemeni M.N., Corpas F.J., & Ahmad P. (2020) Salicylic acid-induced nitric oxide enhances arsenic toxicity tolerance in maize plants by upregulating the ascorbate-glutathione cycle and glyoxalase system. *J Hazard Mater* 399. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2020.123020.
- Khan M. I. R., Jahan B., AlAjmi M. F., Rehman M. T., Iqbal N., Irfan M., Cehar C. & Khan N. A. (2021) Crosstalk of plant growth regulators protects photosynthetic performance from arsenic damage by modulating defense systems in rice. *Ecotoxicol Environ Saf* 222: 112535. doi:10.1016/J.ECOENV.2021.112535.
- Kovaleva J., Degener J.E. & van der Mei H.C. (2014) *Methylobacterium* and its role in health care-associated infection. *J Clin Microbiol*. 52(5):1317-21. doi: 10.1128/JCM.03561-13.
- Leifert C. & Cassells A.C. (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37:133-138.
- Leifert C., Berger F., Steward G.S.A.B. & Waites W. M. (1994) Plasmid profiles of *Lactobacillus plantarum* found as contaminants in *Hemerocallis* plant tissue cultures. *Let Appl Microbiol* 19:377-379.
- Leifert C., Waites B., Keetley J. W., Wright S., Nicholas J. R. & Waites W. M. (1994) Effect of medium acidification on filamentous fungi, yeasts and bacterial contaminants in *Delphinium* tissue cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 36:149-155.
- Lin D. & Xing B. (2008) Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environ Sci Technol* 42(15): 5580–5585. doi: 10.1021/ES800422X/SUPPL_FILE/ES800422X-FILE002.PDF.

- Lin F., Xu J., Shi J., Li H., & Li B. (2010) Molecular cloning and characterization of a novel glyoxalase I gene TaGly I in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Biology Reports* 37(2):729–735.
- Livak K.J. & Schmittgen T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25(4): 402–408. doi: 10.1006/METH.2001.1262.
- Longoria-Espinoza R., Félix-Gastélum R. & Cordero-Ramírez J. D. (2020) Diversity of endophytic bacteria associated with tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *Mexican Journal of Phytopathology* 38 (2).
- Manikandan V., Velmurugan P., Park J.H., Chang W.S., Park Y.J., Jayanthi P., Cho M. & Oh B.T. (2017) Green synthesis of silver oxide nanoparticles and its antibacterial activity against dental pathogens. *3 Biotech* 7(1):72. doi:10.1007/s13205-017-0670-4.
- Manzo-Rodríguez S.M. (2010) Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* var. *coahuilensis* (Broedeker) Moran y *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto a partir de semilla para su conservación. [Tesis de maestría, Institución de Enseñanza e Investigación de Ciencias Agrícolas]. México.
- Marchler-Bauer A., Derbyshire M.K., Gonzales N.R., Lu S., Chitsaz F., Geer L.Y., Geer R.C., He J., Gwadz M., Hurwitz D.I., Lanczycki C.J., Lu F., Marchler G.H., Song J.S., Thanki N., Wang Z., Yamashita R.A., Zhang D., Zheng C. & Bryant S.H. (2015) CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res* 43(Database issue):D222–6. doi: 10.1093/nar/gku1221.
- Meza-Rangel E., Tafoya F., Lindig-Cisneros R., Sigala-Rodríguez J.J., y Pérez-Molphe-Balch E. (2014) Distribución actual y potencial de las cactáceas *Ferocactus histrix*, *Mammillaria bombycina* y *M. perezdelarosae* en el estado de Aguascalientes, México. *Acta Botánica Mexicana* 108: 67.
- Milewska-Hendel A., Witek W., Rypień A., Zubko M., Baranski R., Stróż D., & Kurczyńska E. U. (2019) The development of a hairless phenotype in barley roots treated with gold nanoparticles is accompanied by changes in the symplasmic communication. *Scientific Reports* 9(1): 1–17. doi:10.1038/s41598-019-41164-7.
- Mirmoeini T., Pishkar L., Kahrizi D., Barzin G., & Karimi N. (2021) Phytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles on *Camelina sativa* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 27(2): 417–427. doi:10.1007/S12298-021-00946-Y/METRICS.
- Misra K., Banerjee A. B., Ray S., & Ray M. (1995) Glyoxalase III from *Escherichia coli*: a single novel enzyme for the conversion of methylglyoxal into D-lactate without reduced glutathione. *The Biochemical Journal* 305(3): 999–1003.
- Montesinos-Cruz J.A., Rodríguez-Larramendi L., Ortiz-Pérez R., Fonseca-Flores M.A., Ruíz-Herrera G. y Guevara-Hernández F. (2015) Pitahaya (*Hylocereus* spp.) un recurso fitogenético con historia y futuro para el trópico seco mexicano. *Cultivos Tropicales* 36: 69-70, 72-73.

- Muñoz-Carrillo M. G., Garcidueñas-Piña C., Valerio-García R.C., Carrazco-Rosales J.L. y Morales-Domínguez J.F. (2020) Síntesis verde de nanopartículas de plata del fruto *Opuntia ficus-indica* y su actividad contra Microorganismos de aguas residuales tratadas. *Journal of Nanomaterials*. 2020, 10. doi:10.1155/2020/6908290
- Muñoz-Carrillo M.G. (2022) Evaluación de la actividad antibacteriana de péptidos sintéticos y de nanopartículas de plata (AgNPs) derivadas de *Opuntia ficus-indica*. [Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Aguascalientes]. Repositorio Bibliográfico de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/11317/2321
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473–497. doi:10.1111/J.1399-3054.1962.TB08052.X.
- Murray M.G. & Thompson W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8(19):4321-5. doi: 10.1093/nar/8.19.4321.
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59(3):695-700. doi: 10.1128/aem.59.3.695-700.1993.
- Nair D.N. & Padmavathy S. (2014) Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *ScientificWorldJournal* 22;2014:250693. doi:10.1155/2014/250693.
- Navarrete Maya R., Aranda Ocampo S., Rodríguez Mejía M. L., Moya Hernández S. L., y González Ochoa, M.G. (2014) Bacterias Fitopatógenas en Semillas: Su Detección y Regulación. *Revista mexicana de fitopatología* 32(2), 75-88.
- Pastelín-Solano M., Ramírez-Mosqueda M., Bogdanchikova N., Castro C., & Bello-Bello J (2020) Silver nanoparticles affect the micropropagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *Agrociencia* 54: 1–13
- Pastelín-Solano M.C., Ramírez Mosqueda M.A., Bogdanchikova N., Castro González C.G. & Bello-Bello J.J. (2020) Nanopartículas de plata afectan la micropropagación de la vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *Agrociencia* 54(1).
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., & Ferrin T.E. (2004) *J Comput Chem* (13):1605-12.
- Pirtskhalava M., Vishnepolsky B., Grigolava M., Managadze G. (2021) Physicochemical Features and Peculiarities of Interaction of AMP with the Membrane. *Pharmaceuticals (Basel)* 17;14(5):471. doi:10.3390/ph14050471.
- Prabhu S. & Poulouse K.E. (2012) Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters* vol. 2: 32.

- Quezada Rivera J.F. (2018). Obtención de péptidos antimicrobianos recombinantes derivados de *Moringa oleifera* Lam y *Enterococcus* spp. [Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Aguascalientes]. Repositorio Bibliográfico de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/11317/1612>
- Quezada Rivera J.F., Muñoz-Carrillo M.G., Morales Domínguez J.F. (2022) Péptidos antimicrobianos de plantas. En Morales Domínguez, J.F. (Eds.), Algunas aplicaciones biotecnológicas en plantas y microalgas. (pp. 219-251). Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Raja P., Balachandar D., & Sundaram S. (2008) PCR fingerprinting for identification and discrimination of plant-associated facultative methylobacteria. *Indian journal of Biotechnology* 7, 508-514.
- Rajakani R., Narnoliya L., Sangwan N.S., Sangwan R.S., & Gupta V. (2013) Activated charcoal-mediated RNA extraction method for *Azadirachta indica* and plants highly rich in polyphenolics, polysaccharides and other complex secondary compounds. *BMC Res Notes* 6, 125. doi:10.1186/1756-0500-6-125
- Retes-Pruneda J.L., Valadez-Aguilar M. L., Pérez-Reyes M. E. y Pérez-Molphe-Balch E. (2007) Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). *Bol Soc Bot Méx* 81: 9-16.
- Rodríguez-Mendoza C.A., Hernández L.R., Pérez-Armendáriz B., Juárez Z.N. (2021) Bacterias y hongos endófitos de la familia Cactaceae y sus aplicaciones. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 24:1-14.
- Ruiz Torres N. A., García López J. I., Lira Saldivar R., Vera Reyes I., & Méndez Arguello B. (2016) Efecto de Nanopartículas Metálicas y Derivadas del Carbón en la Fisiología de Semillas.
- Sahakyan N., Petrosyan M., & Trchounian A. (2019) The Activity of *Alkanna* Species *in vitro* Culture and Intact Plant Extracts Against Antibiotic Resistant Bacteria. *Curr Pharm Des.* 25(16):1861-1865. doi: 10.2174/1381612825666190716112510.
- Salas-Limón M.J. (2020) Biogeografía de aislamientos del género bacteriano *Methylobacterium*, asociados a las cactáceas *Cylindropuntia* spp. [Tesis de maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla].
- Sangha J.S., Chen Y.H., Kaur J., Khan W., Abduljaleel Z., Alanazi M.S., Mills A., Adalla C.B., Bennett J., Prithiviraj B., Jahn G.C. & Leung H. (2013) Proteome Analysis of Rice (*Oryza sativa* L.) Mutants Reveals Differentially Induced Proteins during Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens*) Infestation. *Int J Mol Sci* 15;14(2):3921-45. doi:10.3390/ijms14023921.
- Sarabia-Ochoa M., Madrigal-Pedraza R., Martínez-Trujillo M., Carreón-Abud Y. (2010) Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12(1): 65 – 71

- Shabir U., Ali S., Magray A.R., Ganai B.A., Firdous P., Hassan T. & Nazir R. (2018) Fish antimicrobial peptides (AMP's) as essential and promising molecular therapeutic agents: A review. *Microb Pathog* 114, 50–56.
- Shishkova S., Las Peñas M. L., Napsucially-Mendivil S., Matvienko M., Kozik A., Montiel J., Patiño A., Dubrovsky J.G. (2013) Determinate primary root growth as an adaptation to aridity in Cactaceae: towards an understanding of the evolution and genetic control of the trait. *Annals of Botany* 112(2): 239–252.
- Sichanova M., Geneva M., Petrova M., Miladinova-Georgieva K., Kirova E., Nedev T., Tsekova D., Iwanov I., Dochev K., Ivanova V. & Trendafilova A. (2022) Improvement of *Stevia rebaudiana* Bertoni *In Vitro* Propagation and Steviol Glycoside Content Using Aminoacid Silver Nanofibers. *Plants* 11(19): 2468. doi:10.3390/PLANTS11192468/S1.
- Spinoso J. (2016) Utilización de nanopartículas de plata en la propagación *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia*) utilizando un sistema de inmersión temporal. Colegio de Postgraduados
- Stevens R.B. (1960) in *Plant Pathology, An Advanced Treatise* (ed. Horsfall JG) 357–429 Academic Press, New York.
- Subedi K.P., Choi D., Kim I., Min B., & Park C. (2011) Hsp31 of *Escherichia coli* K-12 is glyoxalase III. *Mol Microbiol* 81(4): 926–936. doi:10.1111/J.1365-2958.2011.07736.X.
- Suwanarach N., Kumla J. & Lumyong S. (2018) *Spissiomycetes endophytica* (Dothideomycetes, Ascomycota), a new endophytic fungus from Thailand. *Phytotaxa* 333. 219. doi:10.11646/phytotaxa.333.2.5.
- Suwanarach N., Kumla J., Watanabe B., Matsui K. & Lumyong S. (2019) Characterization of melanin and optimal conditions for pigment production by an endophytic fungus, *Spissiomycetes endophytica* SDBR-CMU319. *PLoS ONE* 14(9):e0222187. doi.org/10.1371/journal.pone.0222187
- Tamura K., Stecher G. & Kumar S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022–3027. doi.org/10.1093/molbev/msab120
- Tripathi D.K., Singhb S., Singhb S., Srivastava P.K., Singh V.P., Singh S., Prasad S.M., Singh P.K., Dubey N.K., Pandey A.C & Chauhan D.K. (2017) Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 110: 167–177. doi:10.1016/J.PLAPHY.2016.06.015.
- Umeda M., Hara C., Matsubayashi Y., Li H. H., Liu Q., Tadokoro F. & Uchimiya H. (1994) Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. *Plant Molecular Biology* 25(3): 469– 478.
- Vannini C., Domingo G., Onelli E., Prinsi B., Marsoni M., Espen L., & Bracale, M. (2013) Morphological and Proteomic Responses of *Eruca sativa* Exposed to Silver

Nanoparticles or Silver Nitrate. PLoS One 8(7): 68752. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0068752.

- Velázquez Jiménez A. A. (2020) Establecimiento y propagación *in vitro* de variedades comerciales de pitahaya (*Hylocereus* spp.). [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Aguascalientes]. (Tesis de Maestría). México.
- Wang W., Zhai Y., Cao L., Tan H. & Zhang, R. (2016) Illumina-based analysis of core actinobacteriome in roots, stems, and grains of rice. *Microbiol. Res.* 190, 12–18. doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.003
- Wang Z., Yu Z.X., Solanki M.K., Yang L.T., Xing Y.X., Dong D.F. & Li Y.R. (2020) Diversity of sugarcane root-associated endophytic *Bacillus* and their activities in enhancing plant growth. *J Appl Microbiol* 128(3):814-827. doi:10.1111/jam.14512.
- Wang Z., Yu Z.X., Solanki M.K., Yang L.T., Xing Y.X., Dong D.F. & Li Y.R.. (2020) Diversity of sugarcane root-associated endophytic *Bacillus* and their activities in enhancing plant growth. *J Appl Microbiol* 128(3):814-827. doi:10.1111/jam.14512.
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R. & Schwede T. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 46(W1), W296-W303.
- Wimley W.C. (2010) Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem. Biol* 5, 905–917.
- Wojciech Przemieniecki S., Ruraż K., Kosewska O., Oćwieja M., Gorczyca A. (2024) The impact of various forms of silver nanoparticles on the rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.) – Shifts in microbiome structure and predicted microbial metabolic functions. *Science of The Total Environment* 914. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169824.
- Yadu B., Chandrakar V., Korram J., Satnami M.L., Kumar M. & Keshavkant S. (2018) Silver nanoparticle modulates gene expressions, glyoxalase system and oxidative stress markers in fluoride stressed *Cajanus cajan* L. *J Hazard Mater* 353: 44–52. doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2018.03.061.
- Young-Ki J. & Byung H.K. (2009) Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Disease* 93: 1037.
- Zare Z., Pishkar L., Iranbakhsh A., & Talei D. (2020) Physiological and Molecular Effects of Silver Nanoparticles Exposure on Purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Russian Journal of Plant Physiology* 67(3): 521–528. doi:10.1134/S1021443720030231/METRICS.
- Zarrin M., Ganj F. & Faramarzi S. (2016) Analysis of the rDNA internal transcribed spacer region of the *Fusarium* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Biomed Rep* 4(4):471-474. doi:10.3892/br.2016.615.
- Zucchetti C.S. (2018) Estudio del rol funcional de la enzima glioxalasa I de plantas en la respuesta al ataque por fitopatógenos. [Tesis, Universidad Nacional del Rosario]. 65 pag.

ANEXOS

A) Preparación de medios de cultivo.

A 1. Soluciones concentradas Stock para medio MS (Murashige y Skoog).

Tabla 17. Preparación de soluciones concentradas medio MS.

SOLUCIÓN	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN	CONTENIDO	CANTIDAD
A	1000 X	50 mL	Cloruro de calcio (CaCl ₂ - 2 H ₂ O)	22.000 g
			Yoduro de potasio (KI)	41.500 g
B	1000 X	50 mL	Cloruro de cobalto (CoCl ₂ - 6 H ₂ O)	1.250 mg
			Fosfato monobásico de K (KH ₂ PO ₄)	3.400 g
C	400X	50 mL	Ac. bórico (H ₃ BO ₃)	0.124 g
			Molibdato de sodio (NaMoO ₄)	0.005 g
			Sulfato de magnesio (MgSO ₄ - 7 H ₂ O)	7.400 g
			Sulfato de manganeso (Mn SO ₄ - H ₂ O)	0.340 g
D	400X	50 mL	Sulfato de zinc Zn (SO ₄ - 7 H ₂ O)	0.172 g
			Sulfato de cobre (CuSO ₄ - 5 H ₂ O)	0.50 mg
			Sulfato ferroso (FeSO ₄ - 7 H ₂ O)	0.557 g
E	200 X	100 mL	EDTA disódico (Na ₂ EDTA)	0.745 g
			Glicina	20.00 mg
F	100 X	100 mL	Piridoxina HCl	5.00 mg
			Ac. nicotínico	5.00 mg
			Tiamina HCl	1.00 mg

Mio inositol	1.00 g
--------------	--------

NOTA: Para la solución E se disuelven ambos componentes por separado, calentando de ser necesario y posteriormente se agrega lentamente la solución de Fe a la de EDTA y se afora, la solución debe quedar de color amarillo sin precipitados.

A 2. Procedimiento de preparación de medio de cultivo MS.

Para la preparación de 1 L de medio de cultivo.

- 1) En un vaso de precipitados o matraz de 1 L colocar 850 mL de agua destilada y agregar las siguientes cantidades de las soluciones stock concentradas:

Tabla 18. Concentración de soluciones stock para medio MS.

Solución	Volumen (mL/L)
A	1
B	1
C	2.5
D	2.5
E	5
F	10

- 2) En seguida añadir los siguientes compuestos, procurando agitar hasta disolver:

Tabla 19. Concentración de compuestos para medio MS.

Solución	Cantidad (g/L)
Sacarosa	30.0 g
Nitrato de potasio	1.90 g
Nitrato de amonio	1.65 g

- 3) Una vez disueltos los componentes, ajustar el pH del medio a 5.7 con NaOH o HCl 0.1 N.
- 4) Añadir 10 g/L de Agar como gelificante. Agitar.
- 5) Disolver el gelificante calentando el medio poco a poco y agitando constantemente hasta clarificar.
- 6) Distribuir el medio en frascos de cultivo de vidrio, taparlos y esterilizar en autoclave a 121 °C por 20 min.

7) Sellar los frascos con el medio estéril y almacenarlos hasta su uso.

B) PREPARACIÓN DE BUFFER Y SOLUCIONES.

B1) Buffer de extracción ADN de hongos.

Soluciones madre (50 ml):

Tris HCl 1 M	6.055 g pH=8
NaCl 5 M	14.61 g
EDTA 0.5 M	9.305 g
CH ₃ COO(NH ₄) 7.5 M	28.905 g
CTAB (20%)	10 g

Para preparar buffer de lisis (50 ml) a partir de las soluciones madre.

5 ml	Tris HCl 1 M
14 ml	NaCl 5M
2 ml	EDTA 0.5M
5 ml	CTAB 20%
Aforar	Agua

Antes de usar se agrega 150 μ l de β - Mercaptoetanol por cada 50 ml de buffer.

B2) Buffer de lisis para la extracción RNA.

CTAB	2 %
NaCl	2.5 M
EDTA	50 nM
Tris HCl pH 8	200 mM
PVPP	1.5 %
Agua	cvp

B3) Buffer de extracción de proteínas.

100 mM Tris-HCl pH 8

1 mM EDTA pH 8

0.2% tritón

B4) Reactivo de Bradford

0.01% Azul de Coomasie G-250

5% Etanol

10% Ácido fosfórico

B5) Estándar de albúmina sérica de bovino

1 mg/ml de albúmina sérica de bovino

B6) Buffer de reacción de catalasa

Buffer de fosfatos 0.05 M pH 7

H₂O₂ 0.1 mM

B7) Soluciones método de extracción de plásmidos Birnboim y Doly (1979).

Solución Birnboim I.

25 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM glucosa (estéril). Almacenar a 4 °C.

Solución Birnboim II

NaOH 0.2 N, SDS 1 %. Preparar al momento o guardar hasta 1 semana a temperatura ambiente. Para 1 ml de solución: mezclar 20 µl de NaOH 10 N con 880 µl de agua y añadir 100 µl de SDS 10 %.

Solución Birnboim III

60 ml 5 M Acetato de potasio, 11.5 ml Ác. Acético glacial y 28.5 ml de agua.