

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGIA

TEMA:

Evaluación de la germinación in vitro de arroz (*oryza sativa*), utilizando nanopartículas de plata sintetizadas de *Trichoderma harzianum*.

Autores:

María Indelira Márquez Alcívar
Edgar Adrián Rodas Robles

Director:

MSc Rafael Seleyman Lazo Sulca

Milagro, 2024

Derechos de autor

Sr. Dr.

Fabrizio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, María Indelira Márquez Alcívar y Edgar Adrián Rodas Robles en calidad de autores y titulares de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedemos los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de nuestro Grado, de Magister en Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación Generación de Bioproductos para la mejora del rendimiento agrícola de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizamos a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Los autores declaramos que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 01 de abril de 2024



Firmado electrónicamente por:
MARÍA INDELIRA
MARQUEZ ALCIVAR

Ing. María Indelira Márquez Alcívar
C.I. 0803058957



Firmado electrónicamente por:
EDGAR ADRIAN RODAS
ROBLES

Ing. Édgar Adrián Rodas Robles
C.I. 125897984

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Yo, **Rafael Seleyman Lazo Sulca** en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por la Ing. María Indelira Márquez Alcívar y el Ing. Edgar Adrián Rodas Robles, cuyo tema es **Evaluación de la germinación in vitro de arroz (*oryza sativa*), utilizando nanopartículas de plata sintetizadas de *Trichoderma harzianum*** que aporta a la Línea de Investigación **Generación de Bioproductos para la mejora del rendimiento agrícola**, previo a la obtención del Grado Magister en biotecnología. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 01 abril 2024



MSc Rafael Seleyman Lazo Sulca
C.I.0918859687

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. MÁRQUEZ ALCÍVAR MARÍA INDELIRA**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN IN VITRO DE ARROZ (ORYZA SATIVA), UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS DE TRICHODERMA HARZIANUM.", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	60.00
SUSTENTACIÓN	38.67
PROMEDIO	98.67
EQUIVALENTE	Excelente



Ing. BARZOLA GAIBOR CESAR ANIBAL
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Ph.D. VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO
VOCAL



Ing. GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. RODAS ROBLES EDGAR ADRIAN**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN IN VITRO DE ARROZ (ORYZA SATIVA), UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS DE TRICHODERMA HARZIARUM.", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	60.00
SUSTENTACIÓN	37.33
PROMEDIO	97.33
EQUIVALENTE	Excelente



Ing. BARZOLA GAIBOR CESAR ANIBAL
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Ph.D. VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO
VOCAL



Ing. GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

A mi amado esposo e hijo, pilares de mi fortaleza, quienes han sido mi constante motivación para no rendirme jamás. A mi padre, cuyo amor y enseñanzas son mi guía diaria, a mis abuelos y a mi tía Jessica, cuya memoria y espíritu desde el cielo me iluminan y se enorgullecen de cada paso que doy hacia el éxito.

María Indelira Márquez Alcívar

DEDICATORIA

A mis venerados padres, Augusto Rodas y Mérida Robles:

En cada página de este trabajo, se encuentra tejido el hilo dorado de su amor, sacrificio y sabiduría. Ustedes han sido los arquitectos de mis sueños, construyendo con paciencia y ternura la fortaleza de mi carácter y la amplitud de mi aspiración. Es a sus manos trabajadoras y a sus corazones generosos a quienes debo la posibilidad de este logro y cada paso adelante que he dado. Augusto, padre ejemplar, tu ejemplo de resiliencia y tu enseñanza constante de integridad han sido mi guía. Mérida, madre amorosa, tu compasión y tu aliento han sido mi consuelo y mi motivación. A ustedes, mis padres, dedico no solo este trabajo sino cada fruto que brote de la semilla que plantaron en mí.

Edgar Adrián Rodas Robles

AGRADECIMIENTO

Con profundo cariño y gratitud, dedico este reconocimiento a mi esposo, cuya comprensión y apoyo incondicional han sido mi refugio y fortaleza. Agradezco al Máster Rafael Lazo por su invaluable tiempo y orientación sabia. Mi sincero agradecimiento al Ingeniero Óscar Chenche, cuya paciencia y apoyo constante han sido esenciales durante la realización de este trabajo.

María Indelira Márquez Alcívar

AGRADECIMIENTO

En lo más alto, extendiendo mi más profunda gratitud a Dios, fuente infinita de toda sabiduría y amor. En cada desafío y en cada victoria, he sentido Su presencia guiándome, fortaleciéndome y brindándome la luz necesaria para avanzar. Este trabajo es también un acto de fe, un reflejo del don de la perseverancia y la gracia que he recibido. A Dios, por estar presente en cada detalle y por ser el faro inquebrantable en mi viaje, le ofrezco mi humilde agradecimiento.

Edgar Adrián Rodas Robles

Resumen

La creciente demanda de prácticas agrícolas sostenibles y eficaces ha llevado a la exploración de la nanotecnología como una herramienta innovadora en la agricultura. Las nanopartículas de plata (AgNPs), conocidas por sus propiedades antimicrobianas, emergen como candidatas prometedoras para mejorar la germinación de semillas y el control de patógenos en cultivos. La investigación se centró en evaluar el impacto de las AgNPs, sintetizadas a partir de extractos de *Trichoderma*, en la germinación y el crecimiento inicial de plántulas de arroz (*Oryza sativa*) en comparación con otros tratamientos: extracto de *Trichoderma*, medio MS y agua estéril como control negativo. Se utilizó un diseño experimental con 50 repeticiones por tratamiento, empleando biorreactores esterilizados para garantizar la precisión de los resultados. La longitud de las raíces y de las plantas se midió para evaluar el crecimiento, y se realizó análisis estadísticos, incluyendo ANOVA y pruebas post hoc Tukey HSD, para determinar la significancia de los resultados. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software IBM SPSS versión 2023. Los tratamientos con nanopartículas de plata demostraron ser superiormente efectivos, logrando no solo una tasa de germinación del 100% dentro de las primeras 48 horas sino también promoviendo un crecimiento significativamente mayor tanto en la longitud de la raíz como de la planta en comparación con los otros tratamientos. Además, se evidenció un notable control de patógenos en el grupo tratado con AgNPs, lo que implicó una menor incidencia de enfermedades y un desarrollo más saludable de las plántulas. Los análisis ANOVA y pruebas post hoc Tukey HSD confirmaron la significancia estadística de estos resultados. Además, se observó un control efectivo de patógenos en el tratamiento con AgNPs, en contraste con el crecimiento de microorganismos patógenos en el control negativo. Las nanopartículas de plata sintetizadas presentan un potencial considerable para mejorar la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas, así como para el control de patógenos en cultivos de arroz. Sin embargo, es crucial realizar evaluaciones detalladas de su impacto ambiental y seguridad a largo plazo.

Palabras Clave; Nano partículas de Plata, Germinación, Crecimiento de Plántulas, Control de Patógenos, Agricultura Sostenible, *Oryza sativa*.

Abstract

The increasing demand for sustainable and effective agricultural practices has led to the exploration of nanotechnology as an innovative tool in agriculture. Silver nanoparticles (AgNPs), known for their antimicrobial properties, emerge as promising candidates for improving seed germination and pathogen control in crops. The research focused on evaluating the impact of AgNPs, synthesized from *Trichoderma* extracts, on the germination and initial growth of rice seedlings (*Oryza sativa*) compared to other treatments: *Trichoderma* extract, MS medium, and sterile water as a negative control. An experimental design with 50 repetitions per treatment was used, employing sterilized bioreactors to ensure the precision of the results. Root and plant length were measured to evaluate growth, and statistical analysis, including ANOVA and post hoc Tukey HSD tests, were performed to determine the significance of the results. The statistical analyses were carried out using IBM SPSS software version 2023. Treatments with silver nanoparticles proved to be superiorly effective, achieving not only a 100% germination rate within the first 48 hours but also promoting a significantly greater growth in both root and plant length compared to the other treatments. In addition, a remarkable pathogen control in the group treated with AgNPs was evidenced, implying a lower incidence of diseases and a healthier development of the seedlings. The ANOVA analyses and post hoc Tukey HSD tests confirmed the statistical significance of these results. Furthermore, effective pathogen control was observed in the treatment with AgNPs, in contrast to the growth of pathogenic microorganisms in the negative control. Silver nanoparticles synthesized present considerable potential for improving seed germination and seedling growth, as well as for the control of pathogens in rice crops. However, it is crucial to conduct detailed assessments of their environmental impact and long-term safety.

Keywords: Silver Nanoparticles, Germination, Seedling Growth, Pathogen Control, Sustainable Agriculture, *Oryza sativa*.

Lista de Tablas

Tabla 1 Operacionalización de las variables.....	6
Tabla 2 Diseño de tratamientos.....	27
Tabla 3 Descripción de tratamientos.....	30
Tabla 4 Picos de absorbancia.....	32
Tabla 5 Descriptivos Estadísticos de la Longitud de Raíz por Tratamiento	38
Tabla 6 Descriptivos Estadísticos de la Longitud de la Planta por Tratamiento.....	38
Tabla 7 Pruebas post hoc Tukey HSD para Longitud de Raíz.....	39

Índice / Sumario

Derechos de autor	i
Aprobación del director del Trabajo de Titulación	ii
Aprobación del tribunal calificador	iii
DEDICATORIA	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
AGRADECIMIENTO	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
Introducción	1
CAPÍTULO I: El problema de la investigación	3
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2 Delimitación del problema	3
1.3 Formulación del problema.....	4
1.4 Determinación del tema.....	4
1.5 Objetivo general	5
1.6 Objetivos específicos.....	5
1.7 Hipótesis.....	5
1.8 Declaración de las variables	6
1.8.1 Variable Independiente	6
1.8.2 Variable Dependiente.....	6
1.9 Justificación.....	7
1.10 Alcance y limitaciones	8
1.10.1 Alcance	8
1.10.2 Limitaciones.....	9
CAPÍTULO II: Marco teórico referencial.....	10
2.1 Antecedentes	10
2.1.1 Contenido teórico que fundamenta la investigación	11
2.1.2 Innovación en el cultivo de arroz	12
2.2 Cultivo de arroz	13

2.2.1	Taxonomía del Arroz	13
2.2.2	Cronología de Crecimiento del Arroz	13
2.2.3	Enfermedades en la Primera Etapa de Crecimiento	14
2.3	Nanoparticulas	14
2.3.1	Propiedades de las nanoparticulas.....	15
2.3.2	Aplicaciones de las nanoparticulas	15
2.3.3	Beneficios de las Nanopartículas de Plata en la Agricultura	15
2.3.4	Síntesis de Nanopartículas de Plata mediante Trichoderma	16
2.3.5	Evaluación de la Estabilidad de Nanopartículas	16
2.4	Espectrofotometría.....	17
2.4.1	Principios de la Espectrofotometría UV-Vis en Nanopartículas.....	17
2.4.2	Aplicaciones en Nanopartículas.....	17
2.4.3	Consideraciones Importantes	18
2.4.4	Caracterización de Nanopartículas mediante Espectrofotometría UV.....	19
2.5	Aplicaciones en Nanotecnología	19
2.6	Cultivos In Vitro Producción de Arroz.....	20
2.6.1	Biorreactores	21
2.6.2	Principios de los Bioreactores de Inmersión Temporal	21
2.6.3	Aplicaciones en la Producción de Arroz.....	21
2.6.4	Ventajas de los Bioreactores de Inmersión Temporal.....	21
2.6.5	Desafíos y Perspectivas Futuras.....	22
2.7	Toxicidad y Riesgos Ambientales	22
2.7.1	Efectos en Suelos	22
2.7.2	Efectos en Aguas.....	23
2.7.3	Efectos en Organismos no Objetivo.....	23
2.8	Marco Legal y Normativo en Ecuador	23
2.9	Implicaciones para la Investigación y Aplicación de Nanopartículas	24

CAPÍTULO III: Diseño metodológico	26
---	----

3.1 Tipo y diseño de investigación	26
--	----

3.1.1	Tipo.....	26
3.1.2	Diseño de Investigación.....	26
3.2	La población y la muestra	27
3.2.1	Características de la población	28
3.2.2	Delimitación de la población	28
3.2.3	Tipo de muestra	28
3.2.4	Tamaño de la muestra.....	28
3.2.5	Proceso de selección de la muestra.....	28
3.3	Métodos y técnicas	29
3.3.1	Fase de campo	29
3.3.2	Fase de laboratorio.....	29
4	CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados.....	32
4.1	Análisis de los resultados	32
4.1.1	Análisis de Espectrofotometría para la Síntesis de Nanopartículas de Plata	32
4.1.2	Ensayos con biorreactores	33
4.1.3	Ensayo con plántulas	37
4.2	Interpretación de los resultados.....	39
4.2.1	Crecimiento y Desarrollo de las Plántulas de Arroz	39
4.2.2	Control de Patógenos y Salud de las Plántulas	40
4.2.3	Implicaciones para la Producción Agrícola Sostenible	40
	CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones	41
5.1	Conclusiones	41
5.2	Recomendaciones.....	42

Introducción

La agricultura mundial se encuentra en una encrucijada crítica, enfrentándose a retos sin precedentes que comprometen su capacidad de sustentar a una población en constante crecimiento. Estos desafíos incluyen el cambio climático, que modifica los patrones climáticos y agrava las condiciones de cultivo; la demanda alimentaria creciente derivada del incremento poblacional; y la necesidad imperante de adoptar métodos de cultivo más sostenibles y eficientes. En este complejo escenario, el cultivo del arroz (*Oryza sativa*) se destaca como un componente crítico para la seguridad alimentaria mundial, incluido Ecuador, cuya diversidad climática y geográfica ofrece un potencial considerable para la producción de este cereal esencial en su soberanía alimentaria y desarrollo económico, (Zhāng et al., 2014).

No obstante, la productividad del arroz en Ecuador enfrenta amenazas debido a factores bióticos y abióticos, lo que subraya la necesidad de buscar soluciones innovadoras y sostenibles. El cambio climático representa uno de los mayores desafíos para la agricultura, afectando directamente la productividad y sostenibilidad de los cultivos. Según Kourgialas (2021), los avances en geo informática y manejo de riego son cruciales para garantizar la sostenibilidad del suministro de agua en la agricultura. Por otro lado, Qin et al. (2020) señalan que la variabilidad climática y la salinización del suelo son desafíos significativos que impactan la productividad agrícola y la seguridad alimentaria. Además, Silalertruksa et al. (2017) destacan cómo el aumento de la temperatura global y la escasez de agua suscitan preocupaciones sobre la sostenibilidad de la producción de arroz.

La emergencia de enfermedades como la Pyricularia del arroz, causada por el hongo *Magnaporthe oryzae* (Fernandez & Orth, 2018), y los desafíos en la domesticación y conservación de la diversidad genética del arroz silvestre (Thurber et al., 2010) demandan una búsqueda activa de soluciones innovadoras. La preocupación se extiende a la transferencia de genes de arroz cultivado a sus parientes silvestres, planteando riesgos de hibridación y resistencia a herbicidas (Chen et al., 2004). En este contexto, la adopción de tecnologías agrícolas inteligentes y sostenibles, como la agricultura climáticamente inteligente (Etongo, 2023), y la implementación de prácticas de cultivo que ahorren agua (Hao et al., 2023) se presentan como respuestas fundamentales para superar los retos actuales y futuros.

En la búsqueda constante de aumentar la productividad y la sostenibilidad en la agricultura, la nanotecnología está ganando atención como una innovación revolucionaria. Las nanopartículas

de plata, en particular, se han posicionado en la vanguardia debido a sus distintas propiedades antibacterianas y fungicidas.

La aplicación de AgNPs en la agricultura incluye una variedad de funciones: mejoran la germinación de semillas, estimulan el crecimiento de las plantas, y actúan como agentes antimicrobianos eficaces contra un espectro amplio de patógenos vegetales. Además, su tamaño nanométrico permite una distribución y penetración más efectiva que las formulaciones tradicionales, potenciando su eficacia a menores dosis y reduciendo los residuos químicos en el medio ambiente (Rodríguez et al., 2014).

En Ecuador, la biotecnología moderna ofrece un camino prometedor hacia el desarrollo de prácticas agrícolas más eficientes y sostenibles. La síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) a través de métodos biológicos, particularmente utilizando síntesis verde utilizando organismos biológicos como *Trichoderma*, destaca por su potencial para mejorar la germinación. Esta aproximación no solo aprovecha la capacidad natural del hongo para combatir patógenos, sino que también introduce un método de síntesis verde, alineado con los principios de la biotecnología sostenible, reduciendo la dependencia de productos químicos sintéticos y explorando el potencial de los microorganismos beneficiosos en la agricultura, (Guilger et al., 2017).

La relevancia de las AgNPs en la promoción de la germinación y el crecimiento de plantas, así como su actividad anti fúngica, sugiere un enfoque innovador para incrementar la productividad y sostenibilidad del arroz, especialmente en regiones vulnerables como la cuenca baja del Guayas. La investigación sobre la germinación in vitro utilizando AgNPs sintetizadas a partir de *Trichoderma harzianum* realizada por Almutairi y Alharbi, (2015), muestran el potencial de esta tecnología para mejorar la germinación de las semillas y combatir hongos patógenos, ofreciendo así soluciones prácticas y sostenibles para los desafíos agrícolas actuales.

Este estudio se enfoca en evaluar la germinación in vitro de arroz utilizando nanopartículas de plata sintetizadas por *Trichoderma harzianum*, con el objetivo de explorar nuevas estrategias para mejorar la germinación y el vigor de las plántulas de arroz en condiciones controladas. Considerando la importancia del arroz en la seguridad alimentaria y económica de Ecuador, la implementación de tecnologías innovadoras en su producción puede contribuir significativamente a la sostenibilidad y eficiencia del sector agrícola.

CAPÍTULO I: El problema de la investigación

1.1 Planteamiento del problema.

La biotecnología moderna ofrece herramientas innovadoras para abordar desafíos en la agricultura, como el uso de nanopartículas de plata (AgNPs) debido a sus propiedades antimicrobianas y su potencial para estimular el crecimiento de las plantas Álvarez et al., (2019). La síntesis de AgNPs mediante enfoques biológicos, como el uso de hongos beneficiosos como *Trichoderma harzianum*, se presenta como una alternativa sostenible a los métodos convencionales, reduciendo la dependencia de insumos químicos y minimizando el impacto ambiental (Rodríguez et al., 2014). A pesar de la creciente evidencia sobre la efectividad de las AgNPs en diversos cultivos, su aplicación específica en la germinación y desarrollo temprano del arroz in vitro, no ha sido ampliamente investigada.

La falta de estudios detallados sobre la concentración óptima de AgNPs y su impacto directo en la germinación de semillas de arroz y el crecimiento de plántulas resalta una brecha significativa en el conocimiento (Ramírez et al., 2009). Esta limitación dificulta que los productores de arroz adopten tecnologías de nano biotecnología que podrían mejorar la sostenibilidad y productividad de sus cultivos en condiciones ambientales desafiantes (Romero-Álvarez et al., 2017).

En este contexto, es crucial fomentar la investigación y el desarrollo de la bio-nanotecnología aplicada a la agricultura, especialmente en el cultivo de arroz, los mismos deberán abordar la optimización de la concentración de AgNPs, su impacto en la germinación y crecimiento del arroz, y su viabilidad en condiciones reales de cultivo podrían proporcionar información valiosa para mejorar la producción agrícola en el país.

1.2 Delimitación del problema.

El presente estudio se centra en evaluar el impacto de las nanopartículas de plata sintetizadas mediante extractos de *Trichoderma harzianum* sobre la germinación in vitro de semillas de arroz (*Oryza sativa*). La investigación se delimita a las siguientes áreas.

La germinación de semillas de arroz in vitro, un cultivo de importancia global tanto para la alimentación como para la economía agrícola, será el enfoque central. Se evaluará cómo las

AgNPs influyen en la tasa de germinación y el vigor de las plántulas en condiciones controladas de laboratorio.

Las principales variables a estudiar incluyen la tasa de germinación de las semillas, el crecimiento de las plántulas (medido por longitud de raíz y tallo), y la incidencia de patógenos en las plántulas germinadas. La concentración de AgNPs y el método de aplicación serán variables independientes, mientras que las respuestas de germinación y crecimiento de las plántulas serán las variables dependientes.

Se empleará una metodología de síntesis verde para producir AgNPs utilizando extractos de *Trichoderma harzianum* de un producto comercial, enfocándose en métodos ecológicamente sostenibles. La evaluación de la germinación se realizará in vitro para permitir un control riguroso de las condiciones ambientales y facilitar la observación directa de los efectos de las AgNPs.

Limitaciones geográficas y temporales; Aunque los resultados podrían tener implicaciones globales para la producción de arroz, el estudio se limitará a semillas de variedades específicas de arroz comúnmente cultivadas en la región de la cuenca baja del Guayas, durante el ciclo de cultivo de desarrollo vegetativo.

1.3 Formulación del problema.

¿Cómo influyen las nanopartículas de plata sintetizadas mediante extractos de *Trichoderma harzianum* en la germinación in vitro y el crecimiento temprano de las plántulas de arroz (*Oryza sativa*), en términos de tasa de germinación, crecimiento de las plántulas y resistencia a patógenos, comparado con los tratamientos de germinación convencionales y el control sin tratamiento?

1.4 Determinación del tema.

Evaluación de la germinación in vitro de arroz (*Oryza sativa*), utilizando nanopartículas de plata sintetizadas de *Trichoderma harzianum*.

1.5 Objetivo general.

Evaluar el efecto de las nanopartículas de plata sintetizadas mediante extractos de *Trichoderma harzianum* sobre la germinación in vitro y el crecimiento temprano de las plántulas de arroz (*Oryza sativa*).

1.6 Objetivos específicos.

- ❖ Sintetizar nanopartículas de plata utilizando extractos de *Trichoderma harzianum* bajo condiciones controladas, caracterizando las AgNPs en términos de tamaño por medio de espectrofotometría UV
- ❖ Evaluar el efecto de AgNPs en la tasa de germinación de las semillas de arroz in vitro, identificando la dosis óptima que promueve una mayor tasa de germinación y vigor de las plántulas sin efectos tóxicos adversos.
- ❖ Investigar el impacto de las AgNPs en el crecimiento temprano de las plántulas de arroz, midiendo parámetros como la longitud de raíz y tallo, la biomasa de las plántulas y la tasa de fotosíntesis, para determinar cómo las AgNPs afectan el desarrollo temprano de las plantas.
- ❖ Examinar la eficacia de las AgNPs en la supresión de patógenos durante la germinación y el crecimiento temprano de las plántulas de arroz, comparando la incidencia de enfermedades en los tratamientos con AgNPs frente a los controles y tratamientos convencionales.

1.7 Hipótesis.

La aplicación de nanopartículas de plata sintetizadas utilizando extractos de *Trichoderma harzianum* mejora significativamente la tasa de germinación y el crecimiento temprano de las plántulas de arroz (*Oryza sativa*), y reduce la incidencia de patógenos en comparación con los tratamientos de germinación convencionales y los controles sin tratamiento.

1.8 Declaración de las variables.

1.8.1 Variable Independiente.

- Análisis de Crecimiento
- Control de Patógenos

1.8.2 Variable Dependiente.

- Tasa de germinación: La proporción de semillas que germinan exitosamente bajo diferentes tratamientos con AgNPs, comparada con los controles.
- Crecimiento de las plántulas: Medido en términos de longitud de raíces y tallos, y posiblemente biomasa de las plántulas, bajo los distintos tratamientos.
- Incidencia de patógenos: La presencia o ausencia de patógenos en las plántulas germinadas, evaluada mediante observación directa, conteo de patógenos o métodos moleculares, para determinar el efecto antimicrobiano de las AgNPs.

Tabla 1

Operacionalización de las variables

Variable	Tipo	Definición Conceptual	Definición Operacional	Instrumento de Medida
Tipo de tratamiento	Independiente	El método específico aplicado a las semillas de arroz para estimular la germinación.	1. Nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas a partir de Trichoderma. 2. Medio de cultivo MS. 3. Agua estéril. 4. Extracto de Trichoderma.	Registro del tratamiento aplicado a cada grupo de semillas.
Tasa de germinación	Dependiente	Porcentaje de semillas que germinan bajo diferentes tratamientos.	Número de semillas germinadas dividido por el total de semillas en el tratamiento, multiplicado por 100.	Observación directa y conteo de semillas germinadas.
Crecimiento radicular	Dependiente	Longitud de las raíces de las plántulas de arroz después de la germinación.	Medición en centímetros de la longitud de la raíz desde la base hasta la punta, 7 días después de la germinación.	Regla o calibrador digital.
Biomasa de plántulas	Dependiente	Peso total de las plántulas germinadas en cada tratamiento.	Peso fresco de las plántulas recolectadas, medido en gramos, 14 días después de la germinación.	Balanza de precisión.

Nota; Definición operacional de las variables

Nota; Elaboración propia

1.9 Justificación.

El arroz (*Oryza sativa*) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, sirviendo como alimento básico para más de la mitad de la población global. La seguridad alimentaria y la sostenibilidad de la producción de arroz son, por lo tanto, de suma importancia para la nutrición humana y la estabilidad económica, especialmente en países en desarrollo donde la dependencia del arroz como alimento básico es máxima. Sin embargo, la producción de arroz enfrenta múltiples desafíos, incluidos factores bióticos como los patógenos del suelo, que pueden afectar negativamente la germinación de las semillas, el crecimiento de las plántulas y, en última instancia, el rendimiento de los cultivos (ALIMENTARIO, 2019). Además, el cambio climático y las prácticas agrícolas insostenibles plantean desafíos adicionales, exacerbando los problemas de enfermedades de las plantas y la degradación ambiental (Kourgialas, N. 2021).

La investigación y desarrollo de estrategias de manejo de cultivos innovadoras, sostenibles y eficaces son cruciales. Las nanopartículas de plata (AgNPs) han emergido como una herramienta potencial en la agricultura, aprovechando sus propiedades antimicrobianas para combatir patógenos de plantas. Sin embargo, la síntesis convencional de AgNPs a menudo implica procesos químicos que pueden ser perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana (Sharma et al. 2012) Por lo tanto, la síntesis verde de AgNPs, utilizando organismos como *Trichoderma harzianum*, no solo ofrece un enfoque más sostenible, sino que también puede mejorar la compatibilidad y efectividad de estas nanopartículas en aplicaciones agrícolas

Trichoderma harzianum es bien conocido por sus propiedades antifúngicas y su capacidad para promover el crecimiento de las plantas, lo que lo convierte en un candidato ideal para la síntesis biológica de AgNPs (Kim, S.W., et al. 2012). La utilización de *T. harzianum* para la síntesis de AgNPs podría no solo mejorar la eficacia de las nano partículas contra los patógenos sino también minimizar los posibles efectos tóxicos en el medio ambiente y en las plantas de arroz, promoviendo prácticas agrícolas más ecológicas.

Además, el estudio de la germinación in vitro de semillas de arroz en presencia de AgNPs sintetizadas biológicamente proporciona una plataforma controlada para evaluar detalladamente la eficacia y seguridad de esta tecnología innovadora. Al comprender cómo estas AgNPs afectan la germinación y el crecimiento temprano de las plántulas de arroz, se

podrían identificar concentraciones óptimas y métodos de aplicación que maximicen los beneficios agrícolas mientras minimizan los riesgos ambientales y para la salud.

Desde una perspectiva económica, la mejora de la tasa de germinación y el vigor de las plántulas de arroz mediante el uso de AgNPs podría conducir a un aumento en el rendimiento de los cultivos y, por ende, a una mayor estabilidad económica para los agricultores. Esto es particularmente importante en regiones donde la agricultura representa una parte significativa de la economía local y la subsistencia de las comunidades (Silertruksa et al. 2017).

La sostenibilidad es otro pilar fundamental de esta investigación. Al integrar la síntesis verde de nanopartículas en las prácticas de manejo de cultivos, este estudio apoya los métodos ecológicos representa una estrategia innovadora que podría mejorar la germinación y el crecimiento de las plántulas de arroz sin los impactos negativos asociados con los pesticidas y fungicidas químicos convencionales (ALIMENTARIO, C. 2019).

1.10 Alcance y limitaciones.

La definición de los alcances y limitaciones de este proyecto de investigación es esencial para establecer las expectativas claras respecto a lo que la investigación aspira lograr y reconocer los posibles obstáculos o restricciones que podrían impactar, los resultados. En el proyecto sobre la evaluación de la germinación in vitro de arroz (*Oryza sativa*) utilizando nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas a partir de *Trichoderma harzianum*, se pueden considerar los siguientes puntos.

1.10.1 Alcance.

- Evaluación Exhaustiva de AgNPs: El proyecto se propone sintetizar y caracterizar AgNPs usando extractos de *Trichoderma harzianum*, proporcionando datos detallados sobre su tamaño, morfología, estabilidad, y potencial antimicrobiano.
- Optimización de la Germinación del Arroz: Se pretende identificar la concentración óptima de AgNPs que promueve la mayor tasa de germinación y el crecimiento saludable de las plántulas de arroz, sin efectos tóxicos.
- Análisis del Control de Patógenos: El estudio buscará evaluar la eficacia de las AgNPs en la reducción de la incidencia de patógenos en las plántulas de arroz, comparando con tratamientos convencionales y controles sin tratamiento.

- **Contribución a la Agricultura Sostenible:** A través de la síntesis verde de AgNPs y su aplicación en la germinación de arroz, el proyecto apoya la exploración de tecnologías agrícolas más sostenibles y menos dependientes de químicos sintéticos.

1.10.2 Limitaciones.

- **Especificidad del Cultivo:** Los resultados se obtendrán específicamente para *Oryza sativa* y podrían no ser directamente aplicables a otros tipos de cultivos sin estudios adicionales.
- **Condiciones Controladas de Laboratorio:** La germinación in vitro bajo condiciones controladas podría no reflejar completamente las complejidades y variabilidades de las condiciones de campo, limitando la extrapolación directa de los resultados a ambientes agrícolas reales.
- **Rango Limitado de Concentraciones de AgNPs:** La investigación se centrará en un rango seleccionado de concentraciones de AgNPs, y podrían existir efectos beneficiosos o tóxicos en concentraciones fuera del rango estudiado.
- **Impacto Ambiental a Largo Plazo:** Aunque el estudio evaluará la seguridad y el potencial impacto ambiental de las AgNPs, el seguimiento a largo plazo fuera del alcance del proyecto es crucial para comprender completamente sus efectos en el ecosistema.
- **Variabilidad Biológica:** La variabilidad intrínseca en las respuestas de las semillas de arroz a los tratamientos con AgNPs podría afectar la reproducibilidad de los resultados entre diferentes lotes de semillas o variedades de arroz.

CAPÍTULO II: Marco teórico referencial

2.1 Antecedentes.

La nanotecnología ha emergido como una herramienta prometedora en el ámbito de la agricultura, ofreciendo soluciones innovadoras para la mejora de la germinación de semillas, protección contra patógenos, y entrega eficiente de nutrientes. Mukherjee et al. (2001) destacaron la potencialidad de las nanopartículas para inducir efectos positivos en la tasa de germinación y crecimiento de las plantas. Sharma et al. (2012) investigaron los efectos de las nanopartículas de plata en plantas y concluyeron que, bajo ciertas concentraciones, las AgNPs pueden mejorar el crecimiento de las plantas y aumentar su resistencia a varios estresores. Sin embargo, también señalaron la necesidad de estudios adicionales para comprender completamente los mecanismos subyacentes y los posibles efectos tóxicos a concentraciones más altas.

La síntesis verde de nanopartículas utilizando microorganismos o extractos de plantas se ha propuesto como una alternativa ecológica a los métodos químicos y físicos convencionales. Vanegas et al., (2020), demostraron cómo los extractos de *Trichoderma harzianum* pueden ser utilizados para sintetizar AgNPs con propiedades antimicrobianas significativas, ofreciendo una vía sostenible para la producción de nanopartículas.

El control biológico, utilizando agentes como *Trichoderma harzianum*, se ha reconocido como un enfoque efectivo para manejar enfermedades en cultivos sin recurrir a químicos sintéticos. Harman et al. (2004) revisaron el papel de *Trichoderma* en el biocontrol y su capacidad para mejorar la germinación y el crecimiento de las plantas mediante mecanismos de acción directa e indirecta.

Trichoderma harzianum como agente de biocontrol ha demostrado ser efectivo contra una amplia gama de patógenos de plantas. Este hongo beneficioso actúa a través de varios mecanismos, incluyendo la competencia por nutrientes y espacio, parasitismo directo de patógenos, y la inducción de resistencia sistémica en las plantas hospedantes. Cano, M. A. (2011), destaca la versatilidad de *Trichoderma* en el mejoramiento de la salud del suelo y la promoción del crecimiento vegetal, lo que a su vez puede reducir la incidencia de enfermedades.

El interés en las nanopartículas de plata (AgNPs) para el control de enfermedades de plantas se ha incrementado debido a sus potentes propiedades antimicrobianas. Las AgNPs pueden inhibir el crecimiento de una variedad de patógenos, incluidos hongos, bacterias y virus que afectan a los cultivos. Oroz, M. M. (2009), proporciono evidencia experimental sobre la actividad anti fúngica de las AgNPs, demostrando su potencial para proteger las plantas contra enfermedades.

La síntesis verde de AgNPs utilizando microorganismos, como *Trichoderma harzianum*, o extractos de plantas, ofrece una alternativa ecológica a los métodos químicos convencionales. Esta aproximación no solo reduce la dependencia de productos químicos tóxicos, sino que también puede mejorar la compatibilidad de las nanopartículas con sistemas biológicos. Mukherjee et al. (2013) exploraron la síntesis de AgNPs utilizando extractos de hongos, subrayando su potencial aplicación en el control de enfermedades de plantas.

La integración de estrategias de control biológico y la aplicación de nanotecnología representa un enfoque holístico para el manejo de enfermedades de plantas. La combinación de métodos puede ofrecer una solución más sostenible y eficaz, reduciendo la dependencia de fungicidas químicos y mitigando los riesgos de resistencia de patógenos. La investigación futura debería centrarse en evaluar la eficacia combinada de *Trichoderma* y AgNPs en condiciones de campo, optimizando las dosis y métodos de aplicación para maximizar los beneficios mientras se minimizan los riesgos potenciales.

2.1.1 Contenido teórico que fundamenta la investigación.

La importancia de la innovación en el cultivo de arroz radica en su capacidad para abordar los desafíos actuales y futuros asociados con la seguridad alimentaria, la sostenibilidad agrícola, y el cambio climático. A medida que la población mundial sigue creciendo, la demanda de arroz, un alimento básico para más de la mitad de la población global, continúa aumentando. Sin embargo, la producción de arroz se enfrenta a numerosos retos, incluyendo limitaciones de recursos naturales, cambio climático, y la necesidad de prácticas agrícolas más sostenibles. En este contexto, la innovación surge como un pilar esencial para mejorar los rendimientos del cultivo de arroz, reducir el impacto ambiental y garantizar la seguridad alimentaria a largo plazo.

2.1.2 Innovación en el cultivo de arroz.

El mejoramiento genético ha permitido el desarrollo de variedades de arroz con mayor rendimiento, resistencia a enfermedades y plagas, y adaptabilidad a condiciones ambientales adversas. Investigaciones recientes han enfocado en crear variedades tolerantes a la salinidad, sequía, y temperaturas extremas, así como variedades con mejor calidad nutricional. Sharry, S. (2015), destaca el impacto significativo del mejoramiento genético en la seguridad alimentaria global a través del desarrollo de variedades de arroz de alto rendimiento. La ingeniería genética ha permitido la inserción de genes de resistencia a enfermedades de una especie a otra, superando las barreras de cruzamiento que limitan el mejoramiento convencional. Esto ha resultado en la creación de cultivos transgénicos que pueden resistir ataques de patógenos específicos para los cuales no existían soluciones efectivas previamente. Por ejemplo, la introducción de genes de resistencia a bacterias y virus en variedades de arroz ha demostrado ser efectiva en reducir la incidencia de enfermedades devastadoras como la blástula del arroz y el virus de la hoja blanca del arroz.

La edición genómica, particularmente mediante el uso de CRISPR-Cas9, ha revolucionado el campo del mejoramiento genético al permitir modificaciones precisas en el genoma de las plantas. Mediante esta técnica, es posible desactivar genes que hacen a las plantas susceptibles a enfermedades o modificar genes existentes para mejorar la resistencia. La aplicación de CRISPR-Cas9 en el arroz ha mostrado potencial para crear variedades resistentes a múltiples enfermedades simultáneamente, sin introducir ADN foráneo (Sharry, S. 2015).

La selección asistida por marcadores moleculares es otra herramienta biotecnológica crucial que ha mejorado la eficiencia del mejoramiento convencional. Esta técnica utiliza marcadores genéticos asociados con genes de resistencia a enfermedades para seleccionar individuos con las características deseadas en etapas tempranas del desarrollo de la planta. Esto acelera significativamente el proceso de mejoramiento al permitir la identificación rápida de plantas con resistencia a enfermedades específicas.

La adopción de tecnologías avanzadas en la agricultura, como la agricultura de precisión, sistemas de riego inteligente, y drones para la monitorización de cultivos, ha transformado el manejo de los cultivos de arroz. Estas tecnologías permiten una gestión más eficiente del agua, optimización del uso de fertilizantes y pesticidas, y monitoreo de la salud del cultivo,

contribuyendo a la sostenibilidad y eficiencia de la producción. Amenta, V. et al, (2015), analizan cómo la adopción de tecnologías agrícolas puede mejorar significativamente los rendimientos de los cultivos y la sostenibilidad ambiental.

2.2 Cultivo de arroz.

El cultivo de arroz (*Oryza sativa*) es uno de los cereales más importantes para la alimentación humana, siendo un alimento básico para más de la mitad de la población mundial. Este cultivo tiene una rica historia y una compleja taxonomía que refleja su importancia en diversas culturas a lo largo de los milenios.

2.2.1 Taxonomía del Arroz

El arroz pertenece a la familia de las Poaceae (gramíneas), dentro del género *Oryza*. La especie *Oryza sativa* es la más ampliamente cultivada y consumida a nivel mundial. La taxonomía completa del arroz cultivado es:

Reino: Plantae

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Género: *Oryza*

Especie: *Oryza sativa*

Además de *Oryza sativa*, existe otra especie de arroz cultivada conocida como *Oryza glaberrima* (arroz africano), aunque su importancia es mucho menor en términos de producción y consumo global (Vaughan, D.A. et al, 2008).

2.2.2 Cronología de Crecimiento del Arroz.

El ciclo de crecimiento del arroz se puede dividir en varias etapas principales:

- Germinación: Tras la siembra, las semillas de arroz germinan en aproximadamente 3-7 días, dependiendo de las condiciones ambientales.
- Establecimiento y Crecimiento Vegetativo: Después de la germinación, las plántulas pasan por un rápido crecimiento vegetativo, desarrollando su sistema de raíces y follaje.
- Macollamiento: Esta etapa involucra la formación de tallos adicionales o "macollos" que pueden dar lugar a más panículas y, por lo tanto, a más granos.

- **Floración y Polinización:** El arroz entra en la fase de floración, durante la cual ocurre la polinización, generalmente 2-3 meses después de la siembra.
- **Maduración:** Después de la polinización, los granos comienzan a llenarse y madurar, proceso que dura alrededor de 30 días.
- **Cosecha:** La cosecha generalmente ocurre 4-6 meses después de la siembra, dependiendo de la variedad y las condiciones de cultivo (Sasaki, T., & Burr, B. 2000).

2.2.3 Enfermedades en la Primera Etapa de Crecimiento.

Durante la germinación y las primeras etapas de crecimiento, el arroz es susceptible a varias enfermedades, entre ellas.

- *Pyricularia oryzae*: Causa lesiones en las hojas, tallos, y panículas, afectando gravemente el rendimiento.
- *Rhizoctonia solani*: Produce lesiones en las vainas de las hojas y puede afectar la base del tallo.
- *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*: Provoca el marchitamiento de las plantas y reduce significativamente el rendimiento.

Estas enfermedades pueden ser particularmente devastadoras en las primeras etapas de crecimiento, ya que las plántulas son más vulnerables a los ataques patógenos (Gnanamanickam, SS, et al,1999).

2.3 Nanopartículas.

Las nanopartículas se definen como partículas ultrafinas con al menos una dimensión menor a 100 nanómetros (nm). Debido a su tamaño reducido, las nanopartículas presentan propiedades físicas, químicas y biológicas únicas, diferentes de las de los materiales a granel, incluyendo una alta reactividad superficial y efectos cuánticos. Estas propiedades han llevado a aplicaciones innovadoras en medicina, electrónica, y más recientemente, en la agricultura (Amenta, V. et al, 2015).

Las AgNPs son ampliamente investigadas por sus marcadas propiedades antimicrobianas, las cuales son atribuidas a la liberación de iones de plata que son tóxicos para una amplia gama de microorganismos. Estas nanopartículas han encontrado aplicaciones en el revestimiento de

dispositivos médicos, en filtros de agua y en la protección de cultivos contra patógenos (Mukherjee, P. et al, 2008).

2.3.1 Propiedades de las nanopartículas.

- Área Superficial Aumentada: Debido a su tamaño reducido, las nanopartículas poseen una gran área superficial en comparación con su volumen, lo que aumenta su reactividad y capacidad de interacción con otras sustancias.
- Propiedades Ópticas y Magnéticas: Las nanopartículas pueden mostrar propiedades ópticas y magnéticas únicas que no se encuentran en materiales a escala macroscópica. Por ejemplo, las nanopartículas de oro y plata exhiben colores intensos debido a la resonancia del plasmón superficial, que es sensible al tamaño y la forma de las nanopartículas.
- Interacción con Sistemas Biológicos: Las nanopartículas tienen la capacidad de cruzar barreras biológicas, interactuar con biomoléculas y entrar en células, lo que las hace útiles para aplicaciones biomédicas como la administración dirigida de fármacos y la terapia génica. (Oroz, M. M. 2009).

2.3.2 Aplicaciones de las nanopartículas.

- Medicina: En la entrega dirigida de medicamentos, las nanopartículas pueden ser diseñadas para transportar fármacos específicamente a las células o tejidos objetivo, minimizando los efectos secundarios y mejorando la eficacia del tratamiento.
- Electrónica: Las nanopartículas se utilizan para desarrollar dispositivos electrónicos más pequeños, rápidos y eficientes, incluyendo transistores y sensores.
- Agricultura: Las nanopartículas ofrecen soluciones innovadoras para la protección de cultivos y la mejora de la nutrición de las plantas, por ejemplo, mediante la entrega controlada de pesticidas y nutrientes (Velásquez, C. L. et al, 2015).

2.3.3 Beneficios de las Nanopartículas de Plata en la Agricultura.

Las AgNPs han mostrado un gran potencial en aplicaciones agrícolas, particularmente como agentes antimicrobianos para proteger cultivos contra patógenos. Su uso puede reducir la necesidad de pesticidas químicos, contribuyendo a sistemas de cultivo más sostenibles. Además, las AgNPs pueden promover el crecimiento de las plantas y mejorar la eficiencia en la absorción de nutrientes.

- **Control de Patógenos:** Las AgNPs inhiben el crecimiento de una amplia gama de patógenos vegetales, incluidos hongos, bacterias y virus, a través de mecanismos como la perturbación de las membranas celulares y la inhibición de la respiración celular (Kim, S.W., et al. 2012).
- **Promoción del Crecimiento de las Plantas:** Investigaciones sugieren que las AgNPs pueden estimular el crecimiento de las plantas y mejorar su rendimiento al influir positivamente en la germinación de las semillas y el desarrollo de las raíces (Sharma, P., et al. 2012).

2.3.4 Síntesis de Nanopartículas de Plata mediante Trichoderma.

La síntesis de AgNPs a menudo implica métodos físicos y químicos; sin embargo, estos pueden ser costosos y potencialmente nocivos para el medio ambiente. La síntesis biológica o "verde" utilizando microorganismos como *Trichoderma* presenta una alternativa sostenible. *Trichoderma*, un género de hongos beneficiosos ampliamente utilizado en biocontrol, puede reducir los iones de plata a AgNPs bajo condiciones adecuadas. Este proceso no solo es eco-amigable, sino que también permite la producción de nanopartículas con propiedades antimicrobianas mejoradas (Mukherjee, P., et al. 2001).

2.3.5 Evaluación de la Estabilidad de Nanopartículas.

Según Llabot, J. M., (2008), la estabilidad de las nanopartículas en diferentes medios es crucial para su aplicación práctica. La estabilidad coloidal puede ser evaluada mediante el seguimiento de cambios en el tamaño y la distribución de las nanopartículas a lo largo del tiempo usando DLS, y también mediante la medición de la potencial zeta, que proporciona información sobre la carga superficial y la repulsión electrostática entre las partículas, factores clave para la estabilidad coloidal.

La evaluación detallada de la estabilidad de las nanopartículas es esencial no solo para entender su comportamiento en sistemas biológicos y ambientales sino también para optimizar su síntesis y aplicaciones en la agricultura, como en el caso del control de patógenos en cultivos de arroz. La correcta caracterización de estas propiedades permite el desarrollo de nanopartículas más seguras y efectivas, contribuyendo a la innovación en el manejo de cultivos y la protección ambiental (Bhattacharjee, S. 2016).

2.4 Espectrofotometría.

La espectrofotometría es una técnica analítica fundamental en la química y la bioquímica que mide la cantidad de luz que una muestra absorbe en función de la longitud de onda. Esta técnica se basa en el principio de que cada compuesto absorbe o transmite luz sobre un cierto rango de longitudes de onda. La espectrofotometría UV-Vis es particularmente útil para caracterizar nanopartículas, especialmente nanopartículas metálicas como las de oro y plata, que presentan intensas bandas de absorción en la región visible debido a la resonancia de plasmón de superficie (SPR), (Skoog, D.A., et al, 2017).

2.4.1 Principios de la Espectrofotometría UV-Vis en Nanopartículas.

Las nanopartículas metálicas exhiben fenómenos de SPR, donde los electrones en la superficie de la nanopartícula oscilan en resonancia con la luz visible. Este efecto es altamente dependiente del tamaño, forma, composición y medio ambiente de las nanopartículas, lo que resulta en picos característicos de absorción que se pueden utilizar para inferir estas propiedades. La espectrofotometría UV-Vis permite la detección rápida y no destructiva de estas características, proporcionando una herramienta valiosa para la síntesis y caracterización de nanopartículas (Haiss, W., et al, 2007).

Cuando la luz incide en una muestra, parte de ella puede ser absorbida, reflejada o transmitida. Las nanopartículas, debido a sus tamaños en el rango nanométrico, presentan efectos de resonancia de plasmón superficial (SPR), especialmente notorios en nanopartículas metálicas como las de plata y oro. Este fenómeno ocurre cuando la frecuencia de la luz incidente coincide con la frecuencia de oscilación colectiva de los electrones de la superficie de las nanopartículas, resultando en una absorción y dispersión intensificadas en longitudes de onda específicas.

2.4.2 Aplicaciones en Nanopartículas.

La espectrofotometría UV se emplea ampliamente en la caracterización de nanopartículas para:

- **Determinación del Tamaño y la Distribución de Tamaño:** A través del análisis de los picos, se pueden estimar el tamaño promedio y la distribución de las nanopartículas en una solución.
- **Evaluación de la Concentración de Nanopartículas:** La intensidad del pico de absorción está relacionada con la concentración de nanopartículas, permitiendo su cuantificación.

- Estudios de Estabilidad: La estabilidad coloidal de las nanopartículas en diferentes medios se puede monitorear a través de cambios en los espectros de absorción a lo largo del tiempo (Amendola, V., & Meneghetti, M. 2009).

2.4.3 Consideraciones Importantes.

La presencia de iones o moléculas en el medio puede afectar la resonancia de plasmón superficial, alterando los espectros de absorción.

Aunque la espectrofotometría UV es una herramienta poderosa para la caracterización inicial de nanopartículas, técnicas complementarias como la microscopía electrónica (TEM, SEM) y la dispersión de luz dinámica (DLS) son necesarias para una caracterización más detallada.

La espectrofotometría UV representa una técnica indispensable en el campo de la nanotecnología, ofreciendo un método eficaz y accesible para la caracterización.

- **Aspectos Éticos de la Biotecnología en la Agricultura.**

La Comisión de las Comunidades Europeas. (2007). Deja implícito que la introducción de nanopartículas, particularmente en el cultivo de alimentos básicos como el arroz, requiere una reflexión profunda sobre las implicaciones éticas. La biodiversidad es una preocupación central, ya que la dependencia de variedades de cultivos genéticamente modificados o tratados con nanopartículas podría conducir a una disminución de la diversidad genética de las especies cultivadas. Esto no solo afecta la resiliencia de los sistemas agrícolas ante enfermedades y cambios climáticos, sino también la riqueza de la agro biodiversidad, crucial para los ecosistemas y las culturas locales.

Según ETC Group. (2004). La equidad en el acceso a estas tecnologías avanzadas también es un aspecto ético importante. Existe el riesgo de que solo los agricultores más grandes o las corporaciones tengan los medios para aprovechar las ventajas de la nanotecnología, potencialmente aumentando la brecha entre los productores grandes y pequeños. La democratización del acceso a la tecnología es fundamental para asegurar que los beneficios de la innovación se compartan ampliamente.

Además, la percepción pública de los alimentos producidos mediante la nanotecnología es un tema crítico. La transparencia y la comunicación efectiva son esenciales para construir la

confianza del consumidor y asegurar que los avances tecnológicos sean aceptados y valorados por la sociedad.

La biotecnología y la nanotecnología ofrecen potencial para revolucionar la agricultura, es crucial abordar estas cuestiones éticas para garantizar que los avances sean sostenibles, justos y aceptados por el público. Establecer marcos regulatorios sólidos y fomentar el diálogo entre científicos, agricultores, consumidores y reguladores puede ayudar a navegar estas complejidades éticas y maximizar los beneficios de la tecnología para todos.

2.4.4 Caracterización de Nanopartículas mediante Espectrofotometría UV.

La caracterización de AgNPs mediante espectrofotometría UV proporciona información valiosa sobre sus propiedades ópticas y físico-químicas. Los picos de absorción en el espectro UV se correlacionan con el diámetro de las nanopartículas; por ejemplo, en el caso de las AgNPs, un pico alrededor de 400-450 nm indica la presencia de nanopartículas esféricas pequeñas (Haiss, W., et al, 2007).

2.5 Aplicaciones en Nanotecnología.

La aplicación de la nanotecnología ha revolucionado el ámbito agrícola a través de múltiples innovaciones. Investigaciones como las realizadas por Shang et al. (2019) y He et al. (2019) han demostrado la efectividad de las nanopartículas de plata (AgNPs) para fomentar el crecimiento de las plantas y proteger los cultivos, gracias a sus propiedades antimicrobianas y su influencia positiva en el desarrollo vegetativo. El desarrollo de AgNPs utilizando métodos biológicos, especialmente a través de hongos beneficiosos como *Trichoderma harzianum*, ofrece una ruta más verde y sostenible, disminuyendo la necesidad de productos químicos y mitigando el impacto en el medio ambiente (Duhan et al., 2017).

Avances significativos en agricultura de precisión han sido posibles gracias a la nanotecnología, la cual ha mejorado la capacidad de las plantas para resistir condiciones ambientales adversas como sequía, salinidad y enfermedades (Rastogi et al., 2019). La utilización de nanopartículas de silicio y la biosíntesis de nanopartículas de óxido de zinc han sido beneficiosas para la activación enzimática y el rendimiento de las plantas (Raliya & Tarafdar, 2013). Asimismo, el desarrollo de nanosensores ha permitido monitorizar variables

críticas en la agricultura, incluyendo los niveles de nutrientes, detección de patógenos y la presencia de pesticidas en cultivos (Kim et al., 2017; Gogos et al., 2012).

No obstante, la implementación de nanotecnología en la agricultura enfrenta retos, tales como la potencial toxicidad de las nanopartículas, la ausencia de regulaciones específicas y la necesidad de una mayor comprensión sobre su interacción con seres vivos y el ambiente (Kwak et al., 2017). A pesar de estos desafíos, el espectro de posibilidades que la nanotecnología ofrece para la agricultura es considerable, abriendo caminos hacia el desarrollo de nanofertilizantes, nanopesticidas, nanobiosensores y sistemas de liberación de nanocarriers que podrían potenciar notablemente la productividad y sostenibilidad agrícolas (Mukhopadhyay, 2014; Ghosh, 2023).

2.6 Cultivos In Vitro Producción de Arroz.

Los cultivos in vitro, o la propagación de plantas en condiciones controladas de laboratorio, representan una herramienta valiosa en la biotecnología agrícola. Esta técnica permite el cultivo de tejidos vegetales, células, órganos, o incluso embriones completos en medios de cultivo específicos, bajo condiciones ambientales optimizadas. Para el arroz, los cultivos in vitro facilitan la producción masiva de plantas libres de enfermedades, la conservación de recursos genéticos, y la aceleración de programas de mejoramiento genético (Sharry, S. 2015).

Una aplicación clave de los cultivos in vitro en la producción de arroz es la micro propagación. Esta técnica es esencial para la multiplicación rápida de variedades élite, garantizando uniformidad genética y alta calidad de las plantas producidas. Además, los cultivos in vitro son fundamentales en la ingeniería genética del arroz, permitiendo la introducción de genes de interés que confieren resistencia a enfermedades, tolerancia a estreses abióticos, o mejoras nutricionales (Cañal, M. J., et al. 2001).

La embriogénesis somática y la regeneración de plantas a partir de callos también son técnicas importantes en la biotecnología del arroz. Estos métodos posibilitan la recuperación de plantas a partir de células individuales, lo cual es crucial para la edición genómica y la creación de variantes genéticas que podrían no ser posibles mediante la reproducción sexual convencional. La implementación de cultivos in vitro en la producción de arroz ofrece ventajas significativas, incluida la rápida propagación de material vegetal y la posibilidad de generar plantas con características deseables. Sin embargo, los desafíos técnicos y económicos, como los altos

costos de establecimiento y la necesidad de técnicas especializadas, aún deben abordarse para maximizar su potencial (Freire-Seijo, M. 2003).

Los cultivos in vitro representan una estrategia innovadora para enfrentar los desafíos actuales en la producción de arroz. A través de la optimización de estas técnicas y la superación de barreras existentes, la biotecnología del arroz puede contribuir significativamente a la seguridad alimentaria y la sostenibilidad agrícola en el futuro.

2.6.1 Biorreactores.

Los biorreactores de inmersión temporal (BIT) representan una innovación significativa en el campo de la propagación in vitro, ofreciendo una alternativa eficiente y escalable para la producción masiva de plantas, incluido el arroz (*Oryza sativa*). Esta tecnología se basa en la inmersión periódica de tejidos vegetales en un medio de cultivo líquido, lo que mejora la aireación, el intercambio gaseoso y la disponibilidad de nutrientes en comparación con los sistemas tradicionales de cultivo en agar o medios líquidos estáticos (Salas, J. E., et al. 2011).

2.6.2 Principios de los Biorreactores de Inmersión Temporal.

Los BIT funcionan mediante ciclos programados de inmersión y drenaje, donde el tejido vegetal se sumerge temporalmente en el medio de cultivo líquido y luego se deja drenar. Este método reduce los problemas asociados con la hipoxia y el crecimiento desigual observados en los cultivos in vitro estáticos, promoviendo un crecimiento más uniforme y rápido de las plantas (Etienne, H., & Berthouly, M. 2002).

2.6.3 Aplicaciones en la Producción de Arroz.

En la producción de arroz, los BIT se han utilizado para optimizar la multiplicación y el crecimiento de callos, así como para la regeneración de plantas a partir de tejidos somáticos. Estos sistemas permiten una mayor eficiencia en la producción de plantas transgénicas y en la conservación de germoplasma, facilitando la manipulación genética y la rápida propagación de variedades de arroz mejoradas.

2.6.4 Ventajas de los Biorreactores de Inmersión Temporal.

Los BIT ofrecen varias ventajas sobre los métodos tradicionales de cultivo in vitro, incluyendo:

- Mejora en la eficiencia del uso de espacio y medios de cultivo.
- Reducción del riesgo de contaminación debido al menor manejo de las plantas y al diseño cerrado de los sistemas.
- Aumento en la tasa de crecimiento y mejora de la calidad de las plantas producidas debido a las mejores condiciones de cultivo.

2.6.5 Desafíos y Perspectivas Futuras.

A pesar de sus beneficios, la implementación de BIT en la producción de arroz enfrenta desafíos, como el costo inicial de establecimiento y la necesidad de optimizar los protocolos para diferentes genotipos de arroz. Sin embargo, el potencial para mejorar la eficiencia de producción y la sostenibilidad hace que la investigación y el desarrollo continuo de los BIT sean cruciales para el futuro de la propagación in vitro del arroz (Paek, K.Y., et al. 2005).

La adopción de biorreactores de inmersión temporal en la producción de arroz in vitro representa un avance prometedor hacia la optimización de la propagación de plantas. Con investigaciones adicionales y la adaptación de estos sistemas a las necesidades específicas del cultivo de arroz, los BIT tienen el potencial de revolucionar la producción de arroz, contribuyendo a la seguridad alimentaria y la sostenibilidad agrícola.

2.7 Toxicidad y Riesgos Ambientales.

La introducción de nanopartículas, incluidas las nanopartículas de plata (AgNPs), en la agricultura y otros sectores ha generado preocupaciones sobre su toxicidad potencial y los riesgos ambientales asociados. A pesar de los beneficios significativos que las nanopartículas ofrecen, es crucial comprender su impacto en el medio ambiente, especialmente en suelos, aguas y organismos no objetivo. Aquí se presenta una revisión de los efectos conocidos hasta la última actualización, basada en estudios y revisiones científicas.

2.7.1 Efectos en Suelos.

Las nanopartículas pueden alterar las propiedades físico-químicas del suelo y afectar negativamente la micro biota del suelo, que es esencial para los ciclos de nutrientes y la descomposición de la materia orgánica. Estudios han demostrado que las AgNPs pueden inhibir

el crecimiento de bacterias y hongos beneficiosos, lo que potencialmente altera la estructura de la comunidad microbiana y afecta la salud del suelo (Johansen, A., et al, 2008).

2.7.2 Efectos en Aguas.

Las nanopartículas liberadas al ambiente pueden alcanzar cuerpos de agua a través de la escorrentía agrícola, el tratamiento de aguas residuales y la deposición atmosférica. En ambientes acuáticos, las AgNPs han mostrado ser tóxicas para una variedad de organismos, incluidos peces, invertebrados y algas. La liberación de iones de plata desde las AgNPs contribuye a su toxicidad, afectando la función respiratoria, la reproducción y el desarrollo de los organismos acuáticos (Asharani, P.V. et al, 2008).

2.7.3 Efectos en Organismos no Objetivo.

La exposición a nanopartículas no solo afecta a los patógenos contra los cuales están dirigidas sino también a organismos no objetivo, incluidos polinizadores como abejas y organismos beneficiosos como depredadores naturales de plagas. La biodisponibilidad de nanopartículas en el ambiente puede llevar a la bioacumulación y biomagnificación a lo largo de las cadenas tróficas, presentando riesgos potenciales para la biodiversidad y la salud de los ecosistemas. (Khodakovskaya, M.V. et al, 2012).

2.8 Marco Legal y Normativo en Ecuador.

La implementación y desarrollo de tecnologías basadas en nanopartículas para aplicaciones agrícolas en Ecuador, como en cualquier otro país, debe realizarse en concordancia con la legislación y normativas locales que rigen el uso seguro de nanotecnología, la protección del medio ambiente, y la seguridad alimentaria. Ecuador, como signatario de diversos acuerdos internacionales en estas áreas, tiene un marco legal que podría impactar en la investigación y aplicación de nanopartículas en la agricultura. Se presenta un análisis basado en el contexto normativo general y las implicaciones potenciales para este tipo de investigaciones en Ecuador.

➤ Constitución del Ecuador

La Constitución de la República del Ecuador (2008) establece un marco sólido para la protección del medio ambiente, el uso sostenible de los recursos, y la garantía de la seguridad alimentaria. En particular, los artículos relacionados con los derechos de la naturaleza (Art. 71-

74) y el derecho a un ambiente sano (Art. 14) son relevantes, ya que cualquier aplicación de nanopartículas en la agricultura debe garantizar que no se dañe el ecosistema o la biodiversidad.

“Constitución de la República del Ecuador. (2008). Montecristi: Asamblea Constituyente.”

➤ **Código Orgánico del Ambiente**

El Código Orgánico del Ambiente (2017) regula lo concerniente a la gestión ambiental y el uso sostenible de los recursos naturales en Ecuador. Este código podría aplicarse a la investigación y uso de nanopartículas en la agricultura, especialmente en lo que respecta a la prevención de la contaminación, la gestión de sustancias peligrosas, y la realización de evaluaciones de impacto ambiental para proyectos de investigación y desarrollo.

“Código Orgánico del Ambiente. (2017). Registro Oficial Suplemento 983.”

➤ **Ley Orgánica de Agro biodiversidad, Semillas y Fomento de la Agricultura Sustentable**

Esta ley (2017) promueve la agro biodiversidad, el uso y conservación de semillas, y el fomento de prácticas agrícolas sustentables. La investigación en nanopartículas dirigida a mejorar la productividad agrícola o la resistencia de los cultivos debe alinearse con los principios de sustentabilidad y seguridad alimentaria que esta ley establece.

“Ley Orgánica de Agro biodiversidad, Semillas y Fomento de la Agricultura Sustentable. (2017). Registro Oficial 999.”

2.9 Implicaciones para la Investigación y Aplicación de Nanopartículas.

Antes de la implementación de cualquier tecnología basada en nanopartículas en la agricultura, es necesario realizar evaluaciones de impacto ambiental que cumplan con la normativa ecuatoriana, asegurando que no se generen riesgos para el medio ambiente o la salud humana.

Los productos agrícolas desarrollados mediante el uso de nanopartículas deben cumplir con las normativas de seguridad alimentaria, garantizando que no representen riesgos para los consumidores.

La investigación debe orientarse hacia soluciones que no solo mejoren la productividad agrícola, sino que también fomenten la sostenibilidad y conservación de la agro biodiversidad, en línea con los principios establecidos en la legislación ecuatoriana.

CAPÍTULO III: Diseño metodológico

3.1 Tipo y diseño de investigación.

La investigación descrita, centrada en la evaluación de la germinación in vitro de arroz (*Oryza sativa*) utilizando nanopartículas de plata sintetizadas a partir de *Trichoderma harzianum*, se clasifica principalmente como una investigación aplicada dentro del campo de la biotecnología agrícola. Este tipo de investigación se caracteriza por su enfoque en la aplicación práctica de conocimientos científicos para resolver problemas específicos, en este caso, la mejora de la germinación y el crecimiento inicial del arroz en condiciones controladas, con un enfoque sostenible y ecológico.

3.1.1 Tipo.

- Aplicada; Se centra en la aplicación de conocimientos científicos y tecnológicos para resolver problemas prácticos específicos, en este caso, mejorar la eficiencia de la germinación y el crecimiento inicial de las plantas de arroz, contribuyendo así a los objetivos de desarrollo agrícola y seguridad alimentaria.
- Experimental; Involucra la manipulación controlada de variables —la aplicación de nanopartículas de plata en el proceso de germinación— para estudiar sus efectos en un entorno controlado. Esto permite establecer relaciones de causa y efecto entre la intervención (nanopartículas de plata) y los resultados observados (tasa de germinación y salud de las plántulas).

3.1.2 Diseño de Investigación.

Diseño completamente al azar (DCA), adecuado para experimentos controlados en laboratorio donde se evalúan los efectos de distintos tratamientos sobre una muestra. Este diseño permite la comparación directa de los tratamientos bajo estudio (Montgomery, D.C. 2017).

En este estudio sobre la germinación in vitro de arroz usando diferentes tratamientos en biorreactores, incluyendo nanopartículas de plata sintetizadas a partir de *Trichoderma*, se identifican tanto variables independientes como dependientes. Tabla 2

Para organizar y explicar claramente los tratamientos y las repeticiones mencionadas en el estudio sobre la germinación in vitro de arroz utilizando diferentes tratamientos en biorreactores, aquí se proporciona un cuadro explicativo. Este cuadro ayuda a visualizar la estructura del experimento y asegura que la implementación sea coherente y sistemática.

Tabla 2**Diseño de tratamientos**

Tratamiento	Descripción	Objetivo	Total de Unidades Experimentales
T1 Nanopartículas de Plata (AgNPs)	Nanopartículas de plata sintetizadas utilizando extractos de <i>Trichoderma</i> .	Evaluar el efecto de las AgNPs en la mejora de la germinación y el crecimiento temprano de las plántulas de arroz.	50
T2 Extracto de <i>Trichoderma</i>	Extracto acuoso de <i>Trichoderma</i> aplicado a las semillas.	Investigar el potencial del extracto de <i>Trichoderma</i> en promover la germinación y el crecimiento de las plántulas de arroz.	50
T3 Medio MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog, utilizado como control positivo para la germinación in vitro.	Determinar la eficacia del medio MS estándar en la germinación y crecimiento de las plántulas de arroz.	50
T4 Agua Esteril	Agua estéril utilizada como control negativo.	Establecer la línea base de la germinación y crecimiento de las plántulas de arroz sin ningún tratamiento aditivo.	50

Nota; Total de Unidades Experimentales en el estudio: 200

Este cuadro resume los cuatro tratamientos que serán evaluados en el estudio, cada uno con 50 repeticiones, lo que suma un total de 200 unidades experimentales. La inclusión de controles positivo (medio MS) y negativo (agua estéril) permite evaluar más efectivamente el impacto de las nanopartículas de plata y el extracto de *Trichoderma* en comparación con condiciones estándar y ausencia de tratamiento, respectivamente. El número de repeticiones (50 por tratamiento) ha sido diseñado para proporcionar suficiente poder estadístico para detectar diferencias significativas entre tratamientos. Este diseño experimental facilitará la obtención de resultados confiables y reproducibles, esenciales para la evaluación objetiva de la eficacia de cada tratamiento en la germinación y el crecimiento temprano de las plántulas de arroz.

3.2 La población y la muestra.

Semillas de arroz (*Oryza sativa*) INIAP 14, 4 tratamientos 50 repeticiones por tratamiento

3.2.1 Características de la población.

Semillas de arroz (*Oryza sativa*) INIAP 14, seleccionada por su relevancia agronómica en Ecuador y susceptibilidad conocida a condiciones de estrés durante la germinación.

3.2.2 Delimitación de la población.

La población estará delimitada a semillas de una sola variedad de arroz, asegurando homogeneidad. Las semillas provendrán de un stock reciente para minimizar la variabilidad debido al almacenamiento.

3.2.3 Tipo de muestra.

Aleatoria simple, para asegurar que cada unidad experimental (semilla) tenga la misma probabilidad de ser seleccionada para cualquiera de los tratamientos.

3.2.4 Tamaño de la muestra.

Con un total de 50 repeticiones por tratamiento, el tamaño total de la muestra será de 200 unidades experimentales. Este tamaño de muestra se elige para obtener una potencia estadística adecuada, permitiendo detectar diferencias significativas entre tratamientos.

3.2.5 Proceso de selección de la muestra.

- **Selección de Semillas:** De un lote homogéneo de semillas de arroz, se realizó una selección preliminar para descartar semillas dañadas o de tamaño anormal, asegurando uniformidad en la muestra.
- **Asignación Aleatoria:** Las semillas seleccionadas se asignarán aleatoriamente a uno de los cuatro tratamientos, utilizando técnicas de generación de números aleatorios para distribuir equitativamente las semillas entre los tratamientos.
- **Implementación de Tratamientos:** Los tratamientos (nanopartículas de plata, medio MS, agua estéril y extracto de *Trichoderma*) se aplicarán bajo condiciones controladas en biorreactores de inmersión temporal, siguiendo protocolos estandarizados para cada tratamiento.

Este diseño y metodología proporcionarán una base sólida para evaluar el efecto de diferentes tratamientos en la germinación del arroz, permitiendo comparaciones estadísticamente válidas entre los grupos. La selección y manejo cuidadoso de la muestra garantizarán la validez de los

resultados y facilitarán la interpretación de los impactos de cada tratamiento en la germinación del arroz.

3.3 Métodos y técnicas.

3.3.1 Fase de campo.

La fase de campo consistió en la recolección y selección de semillas para su traslado a laboratorio.

3.3.2 Fase de laboratorio.

➤ Preparación del Extracto de *Trichoderma*.

- Para la preparación de los extractos de *Trichoderma* se utilizó un producto comercial de nombre TRICHO-D, y se procedió a utilizar su dosis comercial utilizando agua estéril para la suspensión, en una proporción de 5g por cada 100ml de H₂O.
- Después de la activación del producto en 1 hora se procedió a realizar el centrifugado al vacío con un papel filtro de 0.2 micrones con la ayuda de un matraz Kitasato, embudo Buchner y bomba al vacío.
- Se obtiene un extracto puro libre de sedimentos.

➤ Síntesis de Nanopartículas de Plata.

- Preparación de una solución de nitrato de plata (AgNO₃) a concentración 9 mili molar.
- Preparación de una solución NaOH a concentración 1M.
- Se realizó una dilución del extracto de *Trichoderma* en una relación 20:1 de H₂O/Extracto de *Trichoderma*.
- Adicionar por cada 75 ml de solución de nitrato de plata 10 ml del extracto diluido y se calienta a 7 min en microondas.
- Posteriormente se ajusta a un pH de 7 con una solución de NaOH 1Molar.
- Incuba la mezcla de reacción a 25-30°C durante 24 horas para permitir la reducción del AgNO₃ a AgNPs.

➤ Centrifugación y Recolección de AgNPs.

- Centrifuga la solución a 5500rpm a 26°C durante 20 minutos para precipitar las AgNPs.
- Descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet de AgNPs en agua destilada estéril para purificar.

- Repite el proceso de centrifugación para asegurar la limpieza de las nanopartículas.
- **Uso de Biorreactores de Inmersión Temporal.**
 - Preparación de Biorreactores con uso de bombas aireadoras, recipientes de vidrio, mangueras de silicón y filtros de aire.
 - Se establecieron tiempos de inmersión en 2 Fases, 1ERA Fase 48 horas de inmersión continua; 2DA Fase Programación mecánica cada 10 horas dos horas de inmersión.
- **Tratamiento de Semillas y Germinación.**

Las semillas previamente seleccionadas no fueron tratadas con ningún producto para garantizar la eficacia de los tratamientos planteados.

Posteriormente las semillas fueron colocadas dentro de los biorreactores esterilizados para luego ser enriquecidos con los tratamientos previamente seleccionados, Tabla 3.

Tabla 3

Descripción de tratamientos

Tratamiento	Descripción	Objetivo del Tratamiento
Nanopartículas de Plata (AgNPs)	Aplicación de nano partículas de plata sintetizadas a partir de extractos de Trichoderma.	Evaluar el efecto promotor de germinación y control de patógenos.
Extracto de Trichoderma	Uso de extracto líquido obtenido de Trichoderma como tratamiento.	Determinar la influencia del extracto fúngico en la germinación y salud de las plántulas.
Medio MS	Utilización del medio de cultivo Murashige y Skoog para la germinación de las semillas.	Comparar con un estándar de germinación en condiciones de laboratorio.
Agua Esteril	Semillas sumergidas en agua esterilizada, sirviendo como control negativo.	Establecer una línea base de germinación sin intervención de tratamientos adicionales.

Nota; Elaboración los autores

➤ **Evaluación de la Germinación**

La germinación, el crecimiento radicular y la biomasa de las plántulas fueron registrados meticulosamente para cada tratamiento. Estas mediciones proporcionaron datos cuantitativos sobre el impacto de cada tratamiento en el desarrollo de las plántulas de arroz, desde la germinación hasta las etapas iniciales de crecimiento.

Para analizar los datos recopilados, se empleó el software IBM SPSS versión 25. Este software permitió realizar análisis estadísticos avanzados, incluyendo pruebas ANOVA para comparar

los efectos de los diferentes tratamientos en las variables de interés. La utilización de este análisis estadístico robusto aseguró la identificación precisa de diferencias significativas entre los tratamientos, proporcionando una base sólida para interpretaciones y conclusiones confiables.

4 CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados

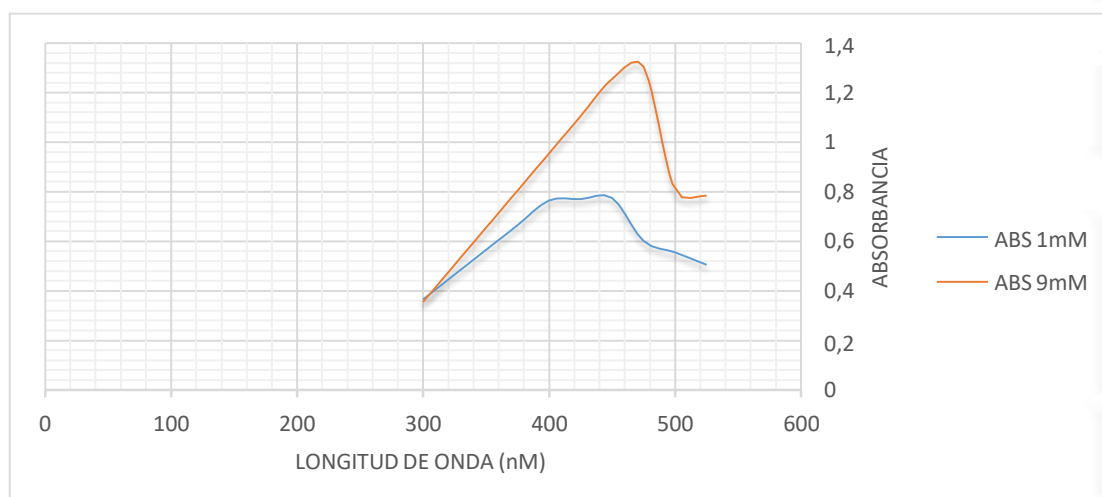
4.1 Análisis de los resultados.

4.1.1 Análisis de Espectrofotometría para la Síntesis de Nanopartículas de Plata.

El análisis espectrofotométrico reveló diferencias claras en la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) al utilizar concentraciones de 1 mM y 9 mM de nitrato de plata. La curva de absorbancia para la concentración de 9 mM muestra un pico pronunciado a 475 nm, lo que sugiere la formación de AgNPs con una resonancia de plasmón superficial (SPR) bien definida. Este pico característico de SPR es indicativo de la presencia de AgNPs en la solución y se asocia comúnmente con la absorción de luz debido a las oscilaciones colectivas de los electrones en la superficie de las nanopartículas.

Tabla 4

Picos de absorbancia



Nota; Fuente elaboración propia, data extraído espectrofotómetro HACH DR 3900.

La intensidad del pico a 475 nm en la curva correspondiente al tratamiento con 9 mM es sustancialmente mayor que la observada en la curva de 1 mM, lo que implica una mayor concentración de AgNPs formadas bajo la condición de mayor concentración de precursor. Además, la posición del pico a una longitud de onda relativamente más larga puede indicar que las nanopartículas formadas en presencia de una concentración más alta de nitrato de plata tienden a ser de mayor tamaño o posiblemente más agregadas lo que concuerda con Rivera-Esteban, J. and Olivas-Alvarez, A. (2021).

En contraste, la absorbancia relativa menor en el tratamiento de 1 mM sugiere una menor formación de nanopartículas y/o la presencia de nanopartículas de menor tamaño. La ausencia de un pico definido en la región de 475 nm para la concentración de 1 mM podría interpretarse como una indicación de una síntesis menos eficiente o de la formación de nanopartículas con propiedades de plasmón superficial menos pronunciadas.

Estos resultados podrían atribuirse a la dinámica de la nucleación y crecimiento de las nanopartículas de plata, que están influenciadas por la concentración del precursor. Una mayor concentración de nitrato de plata proporciona una mayor disponibilidad de iones de plata, lo cual es favorable para la formación de nanopartículas. Sin embargo, también se debe tener en cuenta la posibilidad de que concentraciones más altas de iones de plata puedan conducir a un aumento en la aglomeración de las nanopartículas, como lo sugiere el desplazamiento del pico de SPR hacia longitudes de onda más largas.

4.1.2 Ensayos con biorreactores.

➤ Velocidad de germinación.

En la evaluación de la velocidad de germinación en biorreactores utilizando distintos tratamientos para la germinación de semillas de arroz (*Oryza sativa*), se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados. Un total de 50 unidades experimentales fueron analizadas por tratamiento.

El tratamiento con nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas a partir de extractos de *Trichoderma* (T1), mostró una germinación acelerada, con un total de 47 de las 50 semillas germinando dentro de las primeras 48 horas después del remojo. Este resultado indica un índice de germinación del 94%, superando significativamente la velocidad de germinación de los demás tratamientos evaluados. Estudios previos han resaltado la eficacia de las nanopartículas de plata para estimular la germinación temprana en diversas especies de cultivos, lo cual se atribuye a sus propiedades antimicrobianas y a la mejora en la bio-disponibilidad de nutrientes (Morales-Mávil, J. É. y Alba-Landa, J. 2014).

Figura 1

Germinación in vitro de arroz



Nota; Germinación de Tratamiento 1, aparición de la radícula

Por otro lado, los tratamientos con extracto de *Trichoderma* (T2), medio MS (T3) y agua estéril (T4) presentaron un inicio de germinación más tardío, comenzando a las 72 horas de exposición. En particular, el tratamiento con extracto de *Trichoderma* resultó en 30 semillas germinadas, el tratamiento con medio MS en 33 semillas germinadas, y el control con agua estéril mostró la menor tasa de germinación con 28 semillas germinadas. Estos resultados están en consonancia con las investigaciones que indican un efecto promotor de germinación menos pronunciado por parte de extractos fúngicos y medios de cultivo en comparación con tratamientos que incorporan AgNPs, (Nascimento et al. 2022).

La diferencia en la velocidad de germinación observada podría estar relacionada con el potencial de las nanopartículas de plata para crear un entorno menos propenso a la contaminación microbiana y más favorable para la germinación, como se ha demostrado en estudios similares (Morales-Mávil, J. É. y Alba-Landa, J. 2014). En contraste, el medio MS, aunque nutricionalmente rico, y los extractos de *Trichoderma*, que pueden ofrecer beneficios bioestimulantes, parecen requerir un período de incubación más largo para facilitar la germinación.

El menor desempeño del control con agua estéril resalta la importancia de los tratamientos activos en la promoción de la germinación. Las condiciones estériles por sí solas no parecen suficientes para estimular un proceso de germinación rápido, lo cual es apoyado por la literatura que destaca la influencia positiva de los componentes bioactivos en la aceleración de la germinación (Cano et al. 2015).

➤ **Porcentaje de germinación.**

Tras un periodo de observación de cinco días, se analizó la tasa de germinación total para cada uno de los tratamientos aplicados a las semillas de arroz en los biorreactores. De acuerdo con los datos recopilados, el tratamiento 1 con nanopartículas de plata (AgNPs) alcanzó una tasa de germinación del 100%, con todas las unidades experimentales mostrando germinación exitosa.

Figura 2

Biorreactores proceso de inmersión



Nota; Tratamientos germinados T1, T2, T3

En contraste, los otros tratamientos no lograron superar las tasas de germinación registradas previamente en la fase de velocidad de germinación. Los tratamientos con extracto de Trichoderma, medio MS y agua estéril mantuvieron sus tasas de germinación en los mismos niveles evaluados a las 72 horas, sin mostrar un incremento significativo. Estos hallazgos son consistentes con investigaciones que demuestran un efecto estimulante más poderoso de las AgNPs en comparación con otros tratamientos convencionales o alternativos (Cano et al. 2015).

La ventaja de la germinación acelerada proporcionada por las nanopartículas puede ser atribuida a su influencia en la permeabilidad de la cubierta de la semilla y a su actividad antimicrobiana, que puede disminuir la carga patógena presente y, por lo tanto, promover un ambiente más propicio para la germinación (Saguiñedo et al., 2018). Además, se ha propuesto que las nanopartículas pueden actuar como agentes de señalización que afectan positivamente las rutas hormonales que regulan la germinación.

En resumen, los resultados obtenidos a los 5 días post-tratamiento sugieren que las nanopartículas de plata proporcionan beneficios considerables en términos de germinación en comparación con los métodos tradicionales. El logro de una germinación total en el tratamiento con AgNPs destaca el potencial de la nanotecnología para mejorar la eficiencia de la germinación de cultivos in vitro, lo cual puede tener implicaciones significativas para la producción agrícola y la seguridad alimentaria.

➤ **Control de patógenos.**

Las semillas tratadas con AgNPs mostraron una ausencia notable de crecimiento de microorganismos patógenos, en contraste con el control negativo. Esto se correlaciona con la literatura existente que destaca las propiedades antimicrobianas de las AgNPs, las cuales son efectivas contra una amplia gama de patógenos vegetales, incluidos hongos, bacterias y virus (Ruiz et al., 2020).

Figura 3

Tratamiento 1 libre de patógenos



Nota; Crecimiento progresivo tratamiento con nanopartículas.

En el tratamiento de control, que utilizaba agua estéril sin la presencia de AgNPs, se observó crecimiento de microorganismos patógenos, lo que tuvo un impacto negativo en el desarrollo vegetal. Las plantas de este grupo exhibieron síntomas de clorosis y un aspecto raquítrico, indicativos de estrés y posibles infecciones y su muerte posterior. Estos síntomas son coherentes con la interferencia de patógenos en la absorción de nutrientes y la fotosíntesis, conduciendo a un desarrollo deficiente.

Figura 4

Presencia de patógenos



Nota; Muerte progresiva tratamientos con extracto de Trichoderma y Test negativo.

El uso de nanopartículas como estrategia de control de patógenos representa una alternativa prometedora a los métodos químicos tradicionales, ofreciendo un enfoque sostenible y menos perjudicial para el medio ambiente. Además, las nanopartículas de plata pueden proporcionar una doble función al promover la germinación y el crecimiento temprano de las plantas mientras protegen contra los agentes patógenos.

4.1.3 Ensayo con plántulas.

El análisis del crecimiento de las plántulas y la longitud de las raíces post-germinación reveló diferencias significativas asociadas con el uso de nanopartículas de plata (AgNPs) en el tratamiento experimental. Las plántulas de arroz tratadas con AgNPs exhibieron un crecimiento vegetativo superior en comparación con los tratamientos alternativos. Se observó que la longitud de las plantas y de las raíces en el tratamiento con AgNPs superó notablemente las de los grupos de control y otros tratamientos.

Específicamente, la longitud media de las plantas en el tratamiento con AgNPs fue de 12.16 cm, en comparación con 9.93 cm en el tratamiento con medio MS, 10.87 cm en el tratamiento con extracto de *Trichoderma* y 5.53 cm en el grupo de control con agua estéril. Tabla 5,6 Paralelamente, la longitud media de las raíces en el grupo de AgNPs fue de 2.45 cm, lo que implica un desarrollo radicular más extenso en comparación con los otros tratamientos.

Tabla 5

Descriptivos Estadísticos de la Longitud de Raíz por Tratamiento

Tratamiento	N	Media	DE (Desviación Estándar)	Mínimo	Máximo
Nanopartículas	50	2.45	0.91	1.00	4.00
Extracto <i>Trichoderma</i>	50	1.16	0.61	0.25	2.00
Medio MS	50	0.95	0.42	0.25	1.50
Test Negativo	50	0.74	0.31	0.25	1.25

Nota. DE = Desviación Estándar.

Tabla 6

Descriptivos Estadísticos de la Longitud de la Planta por Tratamiento

Tratamiento	N	Media	DE (Desviación Estándar)	Mínimo	Máximo
Nanopartículas	50	12.16	1.03	11.00	14.50
Extracto <i>Trichoderma</i>	50	10.87	1.75	1.25	12.50
Medio MS	50	9.93	1.21	8.00	11.50
Test Negativo	50	5.53	0.93	4.00	7.00

Nota. DE = Desviación Estándar.

Estos resultados están en consonancia con los informes de la literatura que sugieren que las nanopartículas pueden influir positivamente en la promoción del crecimiento de las plantas y el desarrollo radicular. Las AgNPs, por ejemplo, han sido asociadas con la mejora de la absorción de nutrientes y la estimulación de rutas de señalización que promueven el crecimiento como lo cita Carmona et al., (2018) y que concuerda con los resultados obtenidos. Además, la actividad antimicrobiana de las AgNPs puede contribuir a un ambiente radicular más saludable, favoreciendo así el crecimiento de las raíces.

Cabe destacar que, aunque los mecanismos exactos mediante los cuales las AgNPs mejoran el crecimiento de las plántulas y la longitud de las raíces no se comprenden completamente, estos

resultados proporcionan evidencia convincente de su potencial como agente de promoción del crecimiento en cultivos agrícolas.

En conjunto, los datos sugieren que el tratamiento con nanopartículas de plata ofrece ventajas significativas para el desarrollo temprano de las plántulas de arroz, lo cual puede traducirse en beneficios en términos de rendimiento y salud del cultivo en fases posteriores del desarrollo de la planta.

Tabla 7

Pruebas post hoc Tukey HSD para Longitud de Raíz

Comparación de Tratamiento	Diferencia de Medias	p
Nanopartículas vs Extracto Trichoderma	1.29	< .0001
Nanopartículas vs Medio MS	1.495	< .0001
Nanopartículas vs Test Negativo	1.705	< .0001

Nota; Esta tabla refleja una interpretación simplificada y estructurada de los resultados de ANOVA y pruebas post hoc para dos medidas diferentes: la longitud de la raíz y la longitud de la planta.

Los valores significativos de p ($< .0001$) indican que hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para ambas medidas de crecimiento. Las pruebas post hoc revelan que el tratamiento con nanopartículas es significativamente diferente y superior a los otros tratamientos en términos de la longitud de la raíz.

4.2 Interpretación de los resultados.

4.2.1 Crecimiento y Desarrollo de las Plántulas de Arroz.

Las plántulas de arroz tratadas con nanopartículas de plata mostraron un crecimiento superior, tanto en la longitud de la planta como en la longitud de la raíz, en comparación con las plántulas de los tratamientos control con extracto de Trichoderma, medio MS y agua estéril. Este incremento en el crecimiento puede ser atribuido a las propiedades bioestimulantes de las AgNPs, que han sido reportadas en estudios previos para promover la elongación de la célula y mejorar la división celular, resultando en un crecimiento acelerado de las plantas (Hernández et al., 2019). La mayor longitud de raíz observada sugiere una mejora en la capacidad de las

plantas para absorber agua y nutrientes, lo que podría tener efectos positivos a largo plazo en el vigor y la productividad de las plantas.

4.2.2 Control de Patógenos y Salud de las Plántulas.

El tratamiento con nanopartículas también se asoció con un mejor control de patógenos, como se evidenció por la ausencia de microorganismos patógenos en las muestras tratadas con AgNPs y la presencia de síntomas de enfermedad en las plántulas del control negativo. Esto es coherente con la literatura que destaca la actividad antimicrobiana de las AgNPs, proporcionando así un ambiente más sano para el desarrollo de las plántulas y potencialmente disminuyendo la incidencia de enfermedades transmitidas por el suelo.

4.2.3 Implicaciones para la Producción Agrícola Sostenible

Los resultados de este estudio sugieren que las nanopartículas de plata podrían desempeñar un rol significativo en la producción agrícola sostenible. Su capacidad para estimular el crecimiento de las plántulas y controlar los patógenos, sin los efectos nocivos asociados con los pesticidas químicos convencionales, ofrece una alternativa atractiva para mejorar la salud de las plantas y la seguridad alimentaria.

La aplicación de nanopartículas de plata en la germinación in vitro de plántulas de arroz ofrece ventajas significativas en términos de crecimiento y salud de las plantas. Sin embargo, se requiere una evaluación adicional de la seguridad a largo plazo y el impacto ambiental de las AgNPs para asegurar que su uso sea sostenible y no represente riesgos inadvertidos para el medio ambiente o la salud humana.

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones.

La presente investigación ha demostrado de manera convincente que las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extractos de *Trichoderma* tienen un impacto significativo en la germinación y el crecimiento de las plántulas de arroz. Los tratamientos con AgNPs no solo aceleraron la germinación, evidenciada por una germinación completa a las 48 horas, sino que también mejoraron notablemente el crecimiento radicular y de la planta comparado con los tratamientos estándar y los controles negativos.

Los análisis estadísticos robustos, incluyendo ANOVA y pruebas post hoc Tukey HSD, confirmaron que las diferencias observadas entre los tratamientos con AgNPs y los controles eran estadísticamente significativas, validando así la eficacia de las nanopartículas como promotores de crecimiento. Los resultados de espectrofotometría corroboraron la presencia y consistencia de las nanopartículas de plata, que mostraron un pico de absorbancia característico indicativo de su tamaño para la actividad bioestimulante.

Además del estímulo al crecimiento, las nanopartículas de plata también ofrecieron protección contra patógenos, como se demostró con incidencias nula de microorganismos patógenos en el tratamiento con AgNPs en comparación con el control negativo, que presentó crecimiento microbiano y plántulas con signos de clorosis y crecimiento raquítrico.

La metodología empleada en este estudio, incluyendo el uso de biorreactores como proceso de germinación y el seguimiento detallado de los parámetros de crecimiento, establece un marco para futuras investigaciones centradas en la nanotecnología aplicada a la agricultura. Se observó que el uso de AgNPs podría ser un paso hacia prácticas agrícolas más sostenibles, proporcionando una alternativa al uso de agroquímicos y contribuyendo así a la producción agrícola eco-amigable y a la seguridad alimentaria.

Sin embargo, es fundamental destacar la necesidad de una evaluación cuidadosa del impacto a largo plazo de las nanopartículas en los ecosistemas agrícolas y su seguridad para el consumo humano y animal. Mientras que los resultados de este estudio son prometedores, la adopción generalizada de AgNPs en la agricultura requiere una comprensión profunda de su dinámica en el suelo y su posible bioacumulación en la cadena alimentaria.

5.2 Recomendaciones.

Dado el impacto positivo de las nanopartículas de plata (AgNPs) en la germinación y crecimiento inicial de plántulas de arroz, junto con su potencial como agentes de control de patógenos, la investigación subraya la relevancia de la nanotecnología en la agricultura. Sin embargo, la implementación práctica de estas tecnologías requiere consideraciones detalladas para garantizar su eficacia y seguridad a largo plazo.

Una evaluación profunda del impacto ambiental y ecológico. Mientras que las nanopartículas de plata ofrecen beneficios significativos en términos de promoción del crecimiento y control de patógenos en cultivos de arroz, es crucial realizar evaluaciones detalladas de su impacto ambiental y ecológico antes de su adopción a gran escala, lo que incluye:

- Estudios de Bioacumulación y Toxicidad: Investigar cómo las AgNPs interactúan con diferentes componentes del ecosistema agrícola, incluyendo su potencial de bioacumulación en el suelo y efectos sobre la microbiota del suelo. Es fundamental determinar los niveles seguros de aplicación de AgNPs para evitar efectos adversos en organismos no objetivo y asegurar que no hay riesgo de bioacumulación que podría afectar a consumidores finales.
- Monitoreo de Resistencia a Nanopartículas: Similar al fenómeno de resistencia a los antibióticos, debe vigilarse la posible emergencia de resistencia a las nanopartículas entre los patógenos. Se recomienda la implementación de programas de monitoreo para detectar tempranamente signos de resistencia y ajustar las prácticas de manejo de manera acorde.
- Evaluación de Ciclo de Vida: Realizar estudios de evaluación de ciclo de vida para comprender las implicaciones ambientales de la producción, uso y disposición de las AgNPs. Esto ayudará a identificar y mitigar cualquier impacto ambiental negativo asociado con su ciclo de vida completo.
- Desarrollo de Guías de Aplicación: Basado en la investigación acumulada, desarrollar guías detalladas para la aplicación de nanopartículas en cultivos agrícolas que optimicen los beneficios mientras minimizan los riesgos. Esto puede incluir recomendaciones sobre dosificaciones óptimas, métodos de aplicación, y prácticas de manejo integrado de cultivos que incorporen el uso de AgNPs.

Bibliografía

- Amenta, V., Aschberger, K., Arena, M., Bouwmeester, H., Botelho Moniz, F., Brandhoff, P., Gottardo, S., Marvin, H.J.P., Mech, A., Quiros Pseudo, L., Rauscher, H., Schoonjans, R., Vettori, M.V., Weigel, S., & Peters, R.J.B. (2015). Regulatory aspects of nanomaterials in the EU. *Chemical Society Reviews*, 44, 5771-5795. DOI:10.1039/C4CS00431B
- Amendola, V., & Meneghetti, M. (2009). Size evaluation of gold nanoparticles by UV–vis spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(11), 4277-4285. DOI:10.1021/jp8082425
- Almutairi, Z. and Alharbi, A. (2015). Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants.. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1108056>
- Alimentarius, C. (2019). Programa Conjunto Fao/Oms Sobre Normas Alimentarias Comité Del Codex Sobre Aditivos Alimentarios. *J. química. inf. Modelo*, 53 (9), 1689-1699.
- Álvarez, J., Núñez, M., Chavez, C., Pacheco-Salazar, D., Anaya, A., & Gonzales, C. (2019). Obtención y caracterización del nanocomposito: nano partículas de plata y carboximetilquitosano (npsag-cmq). *Revista De La Sociedad Química Del Perú*, 85(1), 14-24. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v85i1.232>
- Arrieta, A., Ortiz, F., & Escorcía, D. (2021). Biosíntesis de nano partículas de plata con *chlorella* sp. *Revista Ion*, 34(2). <https://doi.org/10.18273/revion.v34n2-2021001>
- Asharani, P.V., Lian Wu, Y., Gong, Z., & Valiyaveetil, S. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 19(25), 255102
- Bashir, M., Raza, Q., Rehim, A., Sial, M., Raza, H., Ali, S., ... & Geng, Y. (2022). Biostimulants application: an innovative approach to food security under drought stress. <https://doi.org/10.5772/intechopen.107055>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- Bozal, R., Navas, J., Gil-Olarte, P., Torre, G., & Zayas, A. (2018). Desarrollo de la inteligencia emocional en la primera infancia: una guía para la intervención. *Universitas Psychologica*, 17(4), 1-12. <https://doi.org/10.11144/javeriana.upsy17-4.diep>
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *trichoderma* spp. y *pseudomonas* spp. una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2). <https://doi.org/10.31910/rudca.v14.n2.2011.771>

- Cano-Vázquez, A., López-Peralta, M., Zavaleta-Mancera, H., Cruz-Huerta, N., Ramírez-Ramírez, I., Gardea, A., ... & González-Hernández, V. (2015). Variación en grados de latencia en semillas entre colectas de chile piquín (*capsicum annum* var. *glabriusculum*). *Botanical Sciences*, 93(1), 175-184. <https://doi.org/10.17129/botsci.138>
- Cañal, M. J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tames, R., & Majada, J. P. (2001). Fisiología del cultivo in vitro. *Biotecnología vegetal*, 1(1).
- Chen, L., Lee, D., Song, Z., Suh, H., & Lu, B. (2004). Gene flow from cultivated rice (*oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. *Annals of Botany*, 93(1), 67-73. <https://doi.org/10.1093/aob/mch006>
- Constitucional, T. (2008). Constitución de la República del Ecuador. Quito-Ecuador: Registro Oficial, 449, 20-10.
- del Ecuador, C. (2017). Ley Orgánica de agrobiodiversidad, semillas y fomento de la agricultura sustentable (Asamblea Nacional).
- Duhan, J., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P., Nehra, K., & Duhan, S. (2017). Nanotechnology: the new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports*, 15, 11-23. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.03.002>
- El-Ashmony, R., Zaghoul, N., Milosevic, M., Mohany, M., Al-Rejaie, S., Abdallah, Y., ... & Galal, A. (2022). The biogenically efficient synthesis of silver nanoparticles using the fungus *trichoderma harzianum* and their antifungal efficacy against *sclerotinia sclerotiorum* and *sclerotium rolfsii*. *Journal of Fungi*, 8(6), 597. <https://doi.org/10.3390/jof8060597>
- ETC Group. (2004). "Down on the Farm: The Impact of Nano-scale Technologies on Food and Agriculture". ETC Group Report.
- Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215-231.
- Etongo, D. (2023). A situational analysis of agricultural development, food, and livelihood security in seychelles: where to from here? *Plos Climate*, 2(4), e0000192. <https://doi.org/10.1371/journal.pclm.0000192>
- Fernandez, J. and Orth, K. (2018). Rise of a cereal killer: the biology of *magnaporthe oryzae* biotrophic growth. *Trends in Microbiology*, 26(7), 582-597. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.12.007>
- Freire-Seijo, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 3(4)

- Ghosh, S. (2023). Plant-derived nanomaterials for targeted biological applications and smart agriculture. *Chemistryselect*, 8(47). <https://doi.org/10.1002/slct.202303495>
- Gnanamanickam, SS, Priyadarisini, VB, Narayanan, NN, Vasudevan, P. y Kavitha, S. (1999). Una visión general de la enfermedad bacteriana del arroz y estrategias para su manejo. *Ciencia actual*, 1435-1444.
- Guilger, M., Pasquoto-Stigliani, T., Bilesky-José, N., Grillo, R., Abhilash, P., Fraceto, L., ... & Lima, R. (2017). Biogenic silver nanoparticles based on trichoderma harzianum: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep44421>
- Gogos, A., Knauer, K., & Bucheli, T. (2012). Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), 9781-9792. <https://doi.org/10.1021/jf302154y>
- Haiss, W., Thanh, N.T.K., Aveyard, J., & Fernig, D.G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV–Vis spectra. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4215-4221. DOI:10.1021/ac0702084
- Hao, J., Xu, X., Meng, X., Chen, J., Yu, K., Xu, X., ... & Wu, Z. (2023). Research progress in water-saving cultivation of rice in china. *Crop Science*, 63(5), 2623-2635. <https://doi.org/10.1002/csc2.21068>
- He, X., Deng, H., & Hwang, H. (2019). The current application of nanotechnology in food and agriculture. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(1), 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.002>
- Hernández, P. E., Ruiz-Torres, N. A., Vázquez-Badillo, M. E., & Sánchez-Aspeytia, D. (2019). Respuesta fisiológica de semillas de chile ancho (capsicum annum l.) a reguladores de crecimiento. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 10(4), 829-837. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1686>
- Jena, B., Senapati, A., Priyadarshinee, L., & Sen, A. (2022). Efficacy of t harzianum isolates in plant growth promotion and blb management in rice. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 20(1), 221-226. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2022.20.1.0298>
- Johansen, A., Pedersen, A.L., Jensen, K.A., Karlson, U., Hansen, B.M., Scott-Fordsmand, J.J., & Winding, A. (2008). Effects of C60 fullerene nanoparticles on soil bacteria and protozoans. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1895-1903.

- Khodakovskaya, M.V., de Silva, K., Biris, A.S., Dervishi, E., & Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano*, 6(3), 2128-2135.
- Kim, S.W., et al. (2012). Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, 40(1), 53-58. DOI:10.5941/MYCO.2012.40.1.053
- Kim, D., Kadam, A., Shinde, S., Saratale, R., Patra, J., & Ghodake, G. (2017). Recent developments in nanotechnology transforming the agricultural sector: a transition replete with opportunities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(3), 849-864. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8749>
- Kourgialas, N. (2021). Editorial: could advances in geoinformatics, irrigation management and climate adaptive agronomic practices ensure the sustainability of water supply in agriculture?. *Water Science & Technology Water Supply*, 21(6), v-vii. <https://doi.org/10.2166/ws.2021.244>
- Kwak, S., Wong, M., Lew, T., Bisker, G., Lee, M., Kaplan, A., ... & Strano, M. (2017). Nanosensor technology applied to living plant systems. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 10(1), 113-140. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061516-045310>
- Montgomery, D.C. (2017). *Design and Analysis of Experiments*. 9th ed. John Wiley & Sons.
- Morales-Mávil, J. É. and Alba-Landa, J. (2014). Germinación de semillas de ficus insipida (moraceae) defecadas por tucanes (ramphastos sulfuratus) y monos araña (ateles geoffroyi). *Revista De Biología Tropical*, 54(2), 387. <https://doi.org/10.15517/rbt.v54i2.13880>
- Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, SR, Khan, MI, y Sastry, M. (2001). Síntesis de nano partículas de plata mediada por hongos y su inmovilización en la matriz micelial: un nuevo enfoque biológico para la síntesis de nano partículas. *Nano letras*, 1 (10), 515-519.
- Mukherjee, P., Roy, M., Mandal, B.P., Dey, G.K., Mukherjee, P.K., Ghatak, J., Tyagi, A.K., & Kale, S.P. (2008). Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperillum*. *Nanotechnology*, 19(7), 075103. DOI:10.1088/0957-4484/19/7/075103
- Mukhopadhyay, S. (2014). Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints. *Nanotechnology Science and Applications*, 63. <https://doi.org/10.2147/nsa.s39409>
- Muñoz-Echeverri, L., Campo-Avenidaño, D., Hoyos-García, M., Velázquez, M., Muñoz-Vergara, J., & Giraldo-Correa, G. (2021). Síntesis verde de nano partículas de zno con

- actividad antibacteriana para funcionalizar textiles de algodón. Informador Técnico, 85(2). <https://doi.org/10.23850/22565035.3645>
- Nascimento, A. M. M. d., Montalbán, I. A., & Moncaleán, P. (2022). El ambiente químico en la etapa de germinación en la embriogénesis somática de pinus halepensis: implicaciones en las características morfológicas de las plántulas desarrolladas. Revista De La Facultad De Agronomía, 121(Especial 2), 099. <https://doi.org/10.24215/16699513e099>
- Llabot, J. M., Palma, S. D., & Allemandi, D. (2008). Nanopartículas poliméricas sólidas. Nuestra Farmacia, 53, 40-47.
- OFICIAL, D. D. R. (2017). Código Orgánico del Ambiente. Quito, Ecuador: Asamblea Nacional de la República de Ecuador, 92.
- Oroz, M. M. (2009). Nano partículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. Anales de Química de la RSEQ, (1), 33-41.
- Paek, K.Y., Chakrabarty, D., & Hahn, E.J. (2005). Application of bioreactors in plant propagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81(3), 319-334.
- Qin, H., Li, Y., & Huang, R. (2020). Advances and challenges in the breeding of salt-tolerant rice. International Journal of Molecular Sciences, 21(21), 8385. <https://doi.org/10.3390/ijms21218385>
- Rastogi, A., Tripathi, D., Yadav, S., Chauhan, D., Živčák, M., Ghorbanpour, M., ... & Brestič, M. (2019). Application of silicon nanoparticles in agriculture. 3 Biotech, 9(3). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1626-7>
- Raliya, R. and Tarafdar, J. (2013). Zno nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme secretion and gum contents in clusterbean (cyamopsis tetragonoloba l.). Agricultural Research, 2(1), 48-57. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0049-z>
- Rivera-Esteban, J. and Olivas-Alvarez, A. (2021). Estudio fotoacústico de nano partículas de oro por ablación láser. Revista Tecnología en Marcha. <https://doi.org/10.18845/tm.v34i2.5010>
- Rodríguez, A., Amor, G., Ceballos, M., López, I., & Vázquez, A. (2014). Infiltración electroforética de nano partículas de plata en depósitos nanoestructurados de tiO2. Quimica Hoy, 4(4), 7. <https://doi.org/10.29105/qh4.4-34>
- Roseline, T., Sudhakar, M., & Arunkumar, K. (2021). Synthesis of silver nanoparticle composites using calliblepharis fimbriata aqueous extract, phytochemical stimulation,

- and controlling bacterial blight disease in rice. *Acs Agricultural Science & Technology*, 1(6), 702-718. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.1c00189>
- Salas, J. E., Agramonte, D., Jiménez-Terry, F., Pérez, M., Collado, R., Barbón, R., ... & Chávez, M. (2011). Propagación de plantas de *Morus alba* var. Criolla con el uso de sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal*, 11(2).
- Sanguiñedo, P., Estevez, M. B., Faccio, R., & Alborés, S. (2018). Nanopartículas de plata biogénicas a partir del hongo *Punctularia atropurpurascens* para el control de microorganismos. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nano ciencias Y Nanotecnología*, 12(22), 1. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2019.22.67627>
- Sanguiñedo, P. (2023). Biogenic silver and copper nanoparticles: potential antifungal agents in rice and wheat crops. *Chemistry*, 5(4), 2104-2119. <https://doi.org/10.3390/chemistry5040143>
- Santos, A., Lamilla, C., Llanquinao, V., Pavez, M., & Barrientos, L. (2017). Nano partículas sintetizadas por bacterias antárticas y sus posibles mecanismos de síntesis. *International Journal of Morphology*, 35(1), 26-33. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022017000100005>
- Sasaki, T., & Burr, B. (2000). International Rice Genome Sequencing Project: the effort to completely sequence the rice genome. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(2), 138-141. DOI:10.1016/S1369-5266(99)00047-3
- Shang, Y., Hasan, K., Ahammed, G., Li, M., Yin, H., & Zhou, J. (2019). Applications of nanotechnology in plant growth and crop protection: a review. *Molecules*, 24(14), 2558. <https://doi.org/10.3390/molecules24142558>
- Sharma, P., et al. (2012). Biogenic silver nanoparticles associated with silver chloride nanoparticles (Ag@AgCl) produced by laccase from *Trametes versicolor*. *Scientific Reports*, 2, 474. DOI:10.1038/srep00474
- Sharry, S. (2015). Plantas de probeta. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Silalertruksa, T., Gheewala, S., Mungkung, R., Nilsalab, P., Lecksiwilai, N., & Sawaengsak, W. (2017). Implications of water use and water scarcity footprint for sustainable rice cultivation. *Sustainability*, 9(12), 2283. <https://doi.org/10.3390/su9122283>
- Skoog, D.A., Holler, F.J., & Crouch, S.R. (2017). *Principles of Instrumental Analysis*. 7th ed. Cengage Learning.

- Thurber, C., Reagon, M., Gross, B., Olsen, K., Jia, Y., & Caicedo, A. (2010). Molecular evolution of shattering loci in u.s. weedy rice. *Molecular Ecology*, 19(16), 3271-3284. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2010.04708.x>
- Vanegas, A. M. M., Marin, A., & Osorno, J. C. (2020). Metabolitos secundarios en trichoderma spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, 41(111), 1-13. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
- Vaughan, D.A., Lu, B.R., & Tomooka, N. (2008). The evolving story of rice evolution. *Plant Science*, 174(4), 394-408. DOI: 10.1016/j.plantsci.2008.01.016
- Velásquez, C. L., Khatib, S. K., & González, F. L. (Eds.). (2015). Nano partículas: fundamentos y aplicaciones. Universidad de los Andes.
- Zhāng, Q., Chen, Q., Wang, S., Yu, H., & Wang, Z. (2014). Rice and cold stress: methods for its evaluation and summary of cold tolerance-related quantitative trait loci. *Rice*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s12284-014-0024-3>

Anexos



Anexo 1; Filtrado al vacío, para extracción de nano partículas



Anexo 2; Curva espectrofotómetro solución 1mM Nitrato de plata



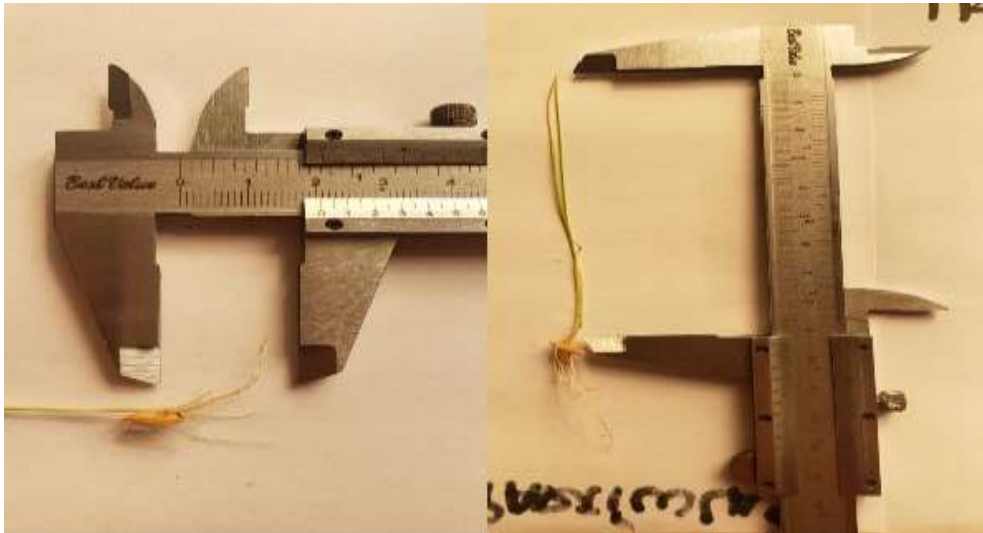
Anexo 3; Curva espectrofotómetro solución 9mM Nitrato de plata



Anexo 4; Preparación de tratamientos en cámara de flujo



Anexo 5; Germinación de la radícula



Anexo 6; (izq.) Medición de Raíz, (der) Medición de elongación de la planta

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

