



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

---

POSTGRADO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA  
SUSTENTABLE

**Evaluación de nanotubos de carbono durante la multiplicación *in vitro* de  
caña de azúcar (*Saccharum spp. cv. Mex 69-290*) en inmersión  
temporal**

**IASP. Monserrat Sorcia Morales**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO**


**2021**


**Evaluación de nanotubos de carbono durante la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. Mex 69-290) en inmersión temporal**

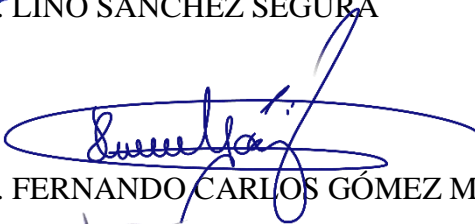
La presente tesis, titulada “Evaluación de nanotubos de carbono durante la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum spp. cv. Mex 69-290*) en inmersión temporal”, realizada por la alumna: **Montserrat Sorcia Morales**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:


MAESTRA EN CIENCIAS  
EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA  
SUSTENTABLE

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:   
DR. JERICÓ JABÍN BELLO BELLO

ASESOR EXTERNO:   
DR. LINO SÁNCHEZ SEGURA

ASESOR INTERNO:   
DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO

ASESOR INTERNO:   
DR. JOEL VELASCO VELASCO

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México,  
2021

Evaluación de nanotubos de carbono durante la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. Mex 69-290) en inmersión temporal

Monserrat Sorcia Morales, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2021

Los nanotubos de carbono tienen un rol importante en la biotecnología vegetal con efectos sobre el crecimiento y diferenciación de células, tejidos, órganos y plantas completas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM durante la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) utilizando un sistema de inmersión temporal. La caracterización morfológica de NTCPM fue realizada en un microscopio electrónico de transmisión. Diferentes concentraciones (0, 50, 100, 200 mg L<sup>-1</sup>) de NTCPM fueron adicionados al medio de cultivo líquido Murashige y Skoog en etapa de multiplicación. A los 30 d de cultivo, se evaluaron diferentes variables de desarrollo, contenido de clorofila, porcentaje de materia seca, porcentaje de carbono, contenido de macro y micronutrientes. Los resultados mostraron un incremento en el desarrollo de brotes de caña de azúcar en las concentraciones de 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM. El contenido de clorofila incrementó en las concentraciones de 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM; mientras que, el contenido de macro y micronutrientes fue variable en las diferentes concentraciones de NTCPM. Los resultados sugieren un efecto hormético, caracterizado por una estimulación en concentraciones bajas y una inhibición para concentraciones altas. En conclusión, el uso de NTCPM tuvo efectos fisiológicos y bioquímicos durante la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar y pueden tener un uso potencial en otras especies de interés agrícola.

**Palabras clave:** cultivo *in vitro*, contenido de carbono, clorofila, macro y micronutrientes, hormesis

Carbon nanotubes play an important role in plant biotechnology due to their effects on the growth and differentiation of cells, tissues, organs and whole plants. This study aimed to evaluate the effect of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) during *in vitro* multiplication of sugarcane (*Saccharum* sp.) using a temporary immersion system. Morphological characterization of MWCNTs was carried out under a transmission electron microscope. Different concentrations (0, 50, 100, 200 mg L<sup>-1</sup>) of MWCNTs were added to Murashige and Skoog liquid culture medium in the multiplication stage. At 30 d of culture, different developmental variables, chlorophyll content, dry matter percentage, carbon percentage, and macro- and micronutrient content were evaluated. Results showed an increase in the development of sugarcane shoots at concentrations of 100 and 200 mg L<sup>-1</sup> of MWCNT. Chlorophyll content increased at concentrations of 50 and 100 mg L<sup>-1</sup> of MWCNT, whereas macro- and micronutrient content was variable at the different MWCNT concentrations. Results suggest a hormetic effect, characterized by stimulation at low concentrations and inhibition at high concentrations. In conclusion, the use of MWCNTs had physiological and biochemical effects during *in vitro* multiplication of sugarcane and may have a potential use in other species of agricultural interest.

**Keywords:** *In vitro* culture, carbon content, chlorophyll, macro- and micronutrients, hormesis.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco principalmente a mis padres y hermanas por el apoyo durante esta etapa y a lo largo de mi vida.

A mis amigos, en especial a Gustavo, Karen y Eucario que se han convertido en mi familia, dándome su apoyo en las buenas y las malas.

A mis compañeros por el apoyo durante mis años en laboratorio de cultivo de tejidos y el Colpos.

Al Colegio de Posgraduados Campus Córdoba. Por brindarme las instalaciones, equipos y recursos económicos para realizar mí proyecto.

A mis académicos, por las enseñanzas durante mi formación durante la maestría.

A mi consejero, el Dr. Jericó Jabín Bello Bello, a mis asesores, Dr. Fernando, Dr. Lino y Dr. Joel.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante la realización de mis Estudios de Maestría.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	11
2.1 Objetivo general.....	11
2.2 Objetivos específicos .....	11
2.3 Hipótesis.....	11
3. MARCO TEÓRICO.....	12
3.1 Cultivo de caña de azúcar.....	12
3.1.2. Clasificación taxonómica.....	12
3.1.3 Importancia del cultivo.....	13
3.1.4 Métodos de reproducción .....	14
3.1.5 Problemática.....	14
3.2 Cultivo de tejidos vegetales (CTV).....	15
3.3 Propagación <i>in vitro</i> .....	15
3.4 Sistemas de inmersión temporal (SIT) .....	17
3.4.1 Biorreactor de inmersión temporal (BIT) .....	18
3.4.2 BIT en caña de azúcar.....	19
3.5 Nanotecnología.....	20
3.6 Nanotubos de carbono (NTCs).....	22
3.6.1 Los nanotubos de carbono en la agricultura.....	23
3.6.3 Los nanotubos de carbono en cultivo de tejidos vegetales .....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1 Ubicación del área de trabajo.....	27
4.2 Estrategia experimental.....	27
4.3 Caracterización de nanotubos de carbono de pared múltiple .....	28
4.4 Establecimiento de explantes caña de azúcar <i>in vitro</i> .....	28
4.5 Aplicación de nanotubos de carbono en cultivos <i>in vitro</i> .....	29

4.6	Evaluación del contenido de macro y micronutrientos.....	29
4.7	Cuantificación del contenido de carbono.....	30
4.8	Contenido de clorofila .....	30
4.9	Diseño experimental y análisis estadístico.....	30
5.	RESULTADOS.....	31
5.2	Efecto de nanotubos de carbono pared múltiple en el desarrollo de brotes, contenido de clorofila y carbono.....	32
5.3	Efecto de los nanotubos de carbono sobre el contenido de macro y micronutrientos .....	35
6.	DISCUSIÓN.....	37
6.1	Desarrollo vegetal y contenido de carbono.....	37
6.2	Contenido de clorofila .....	38
6.3	Contenido de macro y micronutrientos.....	38
6.4	Discusión general .....	39
7.	CONCLUSIONES.....	41
8.	BIBLIOGRAFÍA .....	42
9.	Anexos.....	53



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la micropropagación y sus fases de cultivo .....	16
Figura 2. Modelos de sistemas de inmersión temporal.....	18
Figura 3. Funcionamiento del biorreactor de inmersión temporal.....	19
Figura 4. Aplicaciones de la nanotecnología en agricultura .....	22
Figura 5. Estructura de los nanotubos de carbono .....	23
Figura 6. Nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) observados por microscopia electrónica de transmisión.....	32
Figura 7. Efecto de los nanotubos de carbono de pared múltiple en el desarrollo de brotes, contenido de clorofila y carbono de caña de azúcar ( <i>Saccharum spp.</i> ) cultivadas <i>in vitro</i> en inmersión temporal.....	34
Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de los nanotubos de carbono de pared múltiple en el desarrollo de brotes <i>in vitro</i> de caña de azúcar ( <i>Saccharum spp.</i> ) .....	35

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la caña de azúcar .....	13
Tabla 2. Estudios que demuestran los efectos positivos de los nanotubos de carbono de pared múltiple plantas <i>in vitro</i> .....	25
Tabla 3. Características fisicoquímicas de los nanotubos de carbono de pared múltiple ....	31
Tabla 4. Efecto de nanotubos de carbono de pared múltiple sobre el contenido de macro y micronutrientes de brotes <i>in vitro</i> de caña de azúcar en inmersión temporal.....	36

## **ABREVIATURAS**

NTC	Nanotubos de carbono
NTCPS	Nanotubos de carbono de pared simple
NTCPM	Nanotubos de carbono de pared múltiple
PIB	Producto Interno Bruto
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
SIT	Sistema de inmersión temporal
IT	Inmersión temporal
NP	Nanopartículas
AgNP	Nanopartículas de plata
Nm	nanómetro
MET	Microscopia Electronica de Transmisión
BAP	Bencilaminopurina
KIN	Kinetina
AIA	Ácido indoloacético
MS	Murashige y Skoog

## 1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología en la agricultura es importante para elaboración nanopesticidas, nanofertilizantes, nanoreguladores del crecimiento y nanomateriales para mejorar la producción agrícola (Usman *et al.*, 2020). Los nanomateriales se caracterizan por un ensamblaje ordenado de sus átomos para formar estructuras en una escala manométrica de entre 1 a 100 nm (Shang *et al.*, 2019; Mali *et al.*, 2020). Algunos ejemplos de nanoestructuras de carbón incluyen fullereno, grafeno, nanopartículas, nanofibras, nanoarcillas y nanotubos (Verma *et al.*, 2019; Seleem y Zaidi, 2020). Los nanotubos de carbono (NTC) son láminas enrolladas de grafeno de forma cilíndrica hueca, los cuales se clasifican en nanotubos de carbono de pared simple (NTCPS) y nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) (Ahmad y Silva 2020; Paramo *et al.*, 2020). A diferencia de los NTCPS, los NTCPM tienen una mayor densidad, fuerza de tensión, conductividad eléctrica (Shoukat y Khan 2021) y menor toxicidad en células vegetales (Samadi *et al.*, 2021). Se han descrito algunos efectos de los NTC en las plantas, teniendo mayor efecto sobre el desarrollo, estado nutricional y la fotosíntesis. Sin embargo, los efectos de los NTC en las plantas dependen de la especie, el tipo de NTC, concentración, etapa de desarrollo y las condiciones de cultivo (Martínez-Ballesta *et al.*, 2020).

Por otra parte, los efectos de los NTCPM en plantas solo han sido evaluados en cultivos hidropónicos de brócoli (*Brassica oleracea* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.) y marihuana (*Cannabis sativa* L.) (Martínez-Ballesta *et al.*, 2016; Oloumi *et al.*, 2018). Una alternativa para estudiar con mayor exactitud los efectos de los NTC en plantas es mediante el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Esta técnica permite la manipulación de células, tejidos, órganos o plantas completas bajo condiciones asépticas y controladas. Recientemente se han reportado algunos estudios sobre la administración de NTCPM en cultivos *in vitro* de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), pasto varilla (*Panicum virgatum* L.), tomillo (*Thymus daenensis*) y lirio africano (*Agapanthus praecox*) (Pandey *et al.*, 2018; Samadi *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2020). Sin embargo, los efectos y mecanismos fisiológicos y bioquímicos de los NTC en plantas no han sido completamente elucidados. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de los nanotubos de

carbono (NTC) durante la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) cv. Mex 69-290 utilizando un sistema de inmersión temporal.

## **2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de nanotubos de carbono durante la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* sp. cv. Mex 69-290) en inmersión temporal

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Caracterizar de manera morfológica y morfométrica los nanotubos de carbono de pared múltiple utilizando un microscopio electrónico de transmisión.
2. Evaluar el desarrollo explantes de caña de azúcar durante la multiplicación *in vitro* a diferentes concentraciones de nanotubos de carbono.
3. Determinar el contenido de clorofila en brotes cultivados *in vitro* de caña de azúcar bajo diferentes concentraciones de nanotubos de carbono.
4. Determinar el contenido de carbono en brotes cultivados *in vitro* bajo diferentes concentraciones de nanotubos de carbono.
5. Determinar el contenido de macro y micronutrientes en brotes *in vitro* de caña de azúcar.

### **2.3 Hipótesis**

Los nanotubos de carbono de pared múltiple, adicionados al medio de cultivo en diferentes concentraciones, pueden tener respuesta fisiológica en la etapa de multiplicación *in vitro* en el cultivo de caña de azúcar utilizando biorreactores de inmersión temporal.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Cultivo de caña de azúcar**

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es un cultivo de la familia de las Poaceae que crecen en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Getnet, 2017; Bigott *et al.*, 2019). Es originaria de Asia, donde se cultiva desde hace más de 4000 años, llegó a México en la época de la Colonia; su primera plantación tuvo lugar en el estado de Veracruz que actualmente ocupa el primer lugar con más de la tercera parte de la producción nacional (SADER, 2020).

Se caracteriza por su buena capacidad de adaptación a suelos, clima, manejo, topografía, fertilidad, manejo agronómico y puede alcanzar una altura de entre tres y cuatro metros con un diámetro de 5 cm (Ramírez-Cathí *et al.*, 2014; Redae y Ambaye, 2018). Su desarrollo, inicia en germinación y emergencia, esta etapa empieza de los 7-10 días después de la siembra, a los 35 días después de la plantación, empieza el brote de varios tallos a partir de las articulaciones nodales de la base de los tallos primarios; dando inicio a la etapa de amacollamiento, la cual es de las importante ya que está relacionada con el rendimiento. La etapa de crecimiento dependerá de la variedad, la temperatura y la humedad, durante la maduración de este cultivo se da el proceso de síntesis y acumulación de sacarosa en los tallos, finalmente la etapa de cosecha la cual se refiere a la recolección que se lleva a cabo entre los 11 y 16 meses de la plantación, según el desarrollo de la variedad (temprana, media y tardía) (SADER 2019).

##### **3.1.2. Clasificación taxonómica**

De acuerdo a Estrasburgo *et al.* (1988) la caña de azúcar está ubicada taxonómicamente de la siguiente manera (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la caña de azúcar

<b>Taxones</b>	<b>Clasificación</b>
Super-Reino	Eucariota
Reino	Plantae
División	Spermatophyta
Sub-División	Magnoliophyta
Clase	Liliatae
Sub-Clase	Lilidae
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Sub-Familia	Panicoideae
Tribus	Andropogoneae
Sub-Tribus	Saccharastrae
Género	<i>Saccharum</i>
Especie	<i>Saccharum</i> spp

### 3.1.3 Importancia del cultivo

La caña de azúcar es uno de los cultivos comerciales más importantes principalmente por la obtención de sacarosa. Adicionalmente, de esta planta se pueden obtener más de 200 productos, coproductos, subproductos y derivados, incluyendo su uso en la biofábrica de nuevos productos innovadores (Barnabas *et al.*, 2015; Rivero *et al.*, 2020; Zan *et al.*, 2020).

Durante la zafra 2019/2020 en México operaron 50 ingenios, los cuales procesaron 49,274,468 toneladas de caña bruta, obteniendo 5,278,320 toneladas de azúcar, posicionándolo en el octavo lugar a nivel mundial en producción de azúcar y caña molida (CONADESUCA, 2020). En México hay 267 municipios rurales en 15 estados del país, lo que genera un motor económico y de desarrollo que representa el 2.6% del Producto Interno Bruto (PIB) manufacturero, el 13.8% del PIB agropecuario y el 11.6% del PIB en la industria alimentaria (CONADESUCA, 2020).

### **3.1.4 Métodos de reproducción**

La caña de azúcar tiene capacidad de reproducción sexual y asexual. La propagación en cultivos comerciales se realiza mediante reproducción asexual o técnicas vegetativas que asegura la homogeneidad en las características fenotípicas de la plantación (Hasner *et al.*, 2019). Sin embargo, para la reproducción sexual, la floración está controlada por una serie de factores abióticos como el fotoperíodo, la temperatura, la madurez y la humedad, que de manera simultánea restringe la formación de la semilla, por lo que el método de reproducción de plántulas por la vía asexual es el más usado, implicando la plantación de esquejes de tallo de caña aproximadamente de 8 a 12 meses de edad cultivada con especial cuidado para tomarlos como semilla de caña, los cuales pueden ser tallos enteros o tallos cortados en segmentos más cortos llamados conjuntos (Kaur y Sandhu, 2015; Getnet, 2017).

### **3.1.5 Problemática**

La agroindustria azucarera tiene grandes retos en materia de productividad y competitividad (Rivera *et al.*, 2010); el método de propagación convencional con semilla vegetativa, aunque es simple y rentable, no asegura el saneamiento y rejuvenecimiento de las variedades seleccionadas en el campo (Bello-Bello *et al.*, 2018), la multiplicación tarda un año en generar material de siembra y no elimina las enfermedades que causan algunos virus (Barnabas *et al.*, 2015). Considerando que los productores requieren de una multiplicación rápida, con suficiente cantidad y semilleros puros de nuevas variedades, el cultivo de tejidos vegetales es una herramienta útil para la multiplicación masiva y obtener variedades de caña de azúcar libres de enfermedades (Criollo-Chan *et al.*, 2016; Redae y Ambaye, 2018). Por lo antes mencionado se requiere el uso del cultivo de tejidos vegetales, ya que es una herramienta biotecnológica que permite el establecimiento de plantas libre de plagas y enfermedades, además de la conservación de los recursos fitogenéticos, preservar la variabilidad genética de las poblaciones, el uso de cultivo de tejidos vegetales es complementario para lograr la conservación de los recursos genéticos de caña de azúcar (Bello-Bello *et al.*, 2014).

### **3.2 Cultivo de tejidos vegetales (CTV)**

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una herramienta biotecnológica ampliamente usada en el estudio de las plantas ya sea para su conservación, manipulación, saneamiento, propagación de células, tejidos, órganos y sus componentes bajo condiciones *in vitro* de plantas comestibles, medicinales y ornamentales (Thorpe, 2007; Efferth, 2019), por lo que el cultivo de tejidos vegetales impacta en la mejora de cultivos, la conservación de germoplasma, estudios de genes funcionales, micropropagación, fitomejoramiento y en el rescate de especies amenazadas o en peligro de extinción (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018; Bednarek y Orłowska, 2020). Una alternativa para obtener un gran volumen de plantas a escala y en menor tiempo, es el uso de técnicas como la micropropagación, la cual nos garantiza plantas asépticas para el uso comercial.

### **3.3 Propagación *in vitro***

Se conoce como propagación *in vitro* a la propagación asexual de las plantas utilizando las técnicas *in vitro* de cultivo de tejidos vegetales (Pérez *et al.*, 1999). La micropropagación es el método más prometedor de cultivo de tejidos para la multiplicación y conservación del germoplasma (Chirumamilla *et al.*, 2020), a partir de un fragmento llamado explante de una planta, se obtiene plantas hijas genéticamente idénticas, denominadas clones (Castillo, 2004), sea considerado una de las técnicas de biotecnología agrícola mundial más importantes para la generación rápida de material de alta calidad, uniforme y libre de enfermedades (Martínez-Estrada *et al.*, 2017). Dentro de las principales ventajas que provee el uso de esta técnica, es el desarrollo de un sistema de propagación clonal, independiente de las condiciones externas, con capacidad ilimitada de reproducción (dependiendo de la capacidad del laboratorio), reducción de espacio y tiempo, así como la obtención de plantas con calidad fitosanitaria (Hvoslef-Eide y Preil, 2005; Timoteo *et al.*, 2019). Dentro del proceso de micropropagación diferenciamos varias fases o etapas (Pérez *et al.*, 1999) como se muestra en la Figura 1.



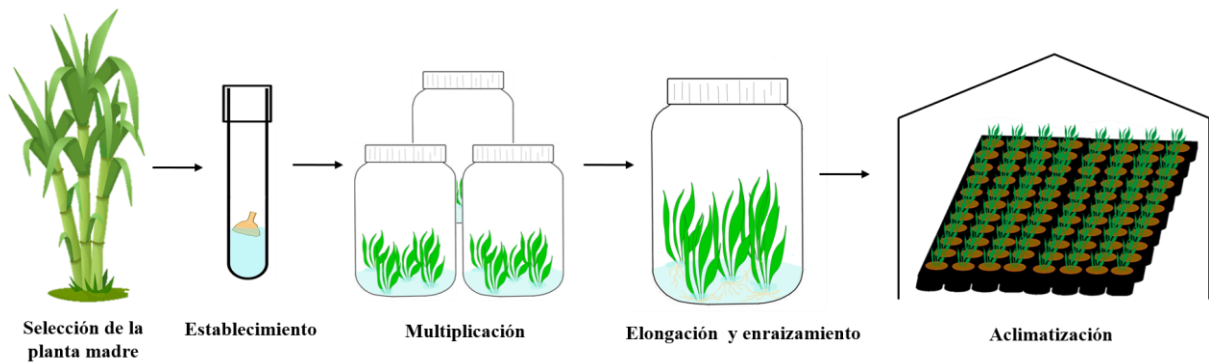


Figura 1. Esquema general de la micropropagación y sus fases de cultivo. a) selección de la planta madre, b) establecimiento *in vitro*, c) multiplicación del tejido, d) elongación y enraizamiento, e) aclimatización.

Etapa 0. Selección de planta madre: es una etapa de gran importancia en cual se seleccionan y acondicionan las plantas madre para asegurar el éxito de la micropropagación, partiendo de una planta con características deseables y vigorosas. En esta etapa se reduce los niveles de contaminación microbiana, iniciando por sanear las plantas madre antes de la toma de explantes, por lo que son trasladados a un ambiente semi controlado como es un invernadero.

Etapa 1. Establecimiento *in vitro*: en esta etapa se selecciona el explante dependiendo de la especie, la forma de multiplicación y su sistema de propagación ya sea por yemas o meristemos, por otro lado, hojas, tallos o tejidos de plantas jóvenes. Posteriormente se lleva un proceso de esterilización.

Etapa 2. Multiplicación de tejido: en esta etapa se realiza de manera concreta la micropropagación donde se obtiene un gran número de brotes nuevos a partir de los explantes establecidos.

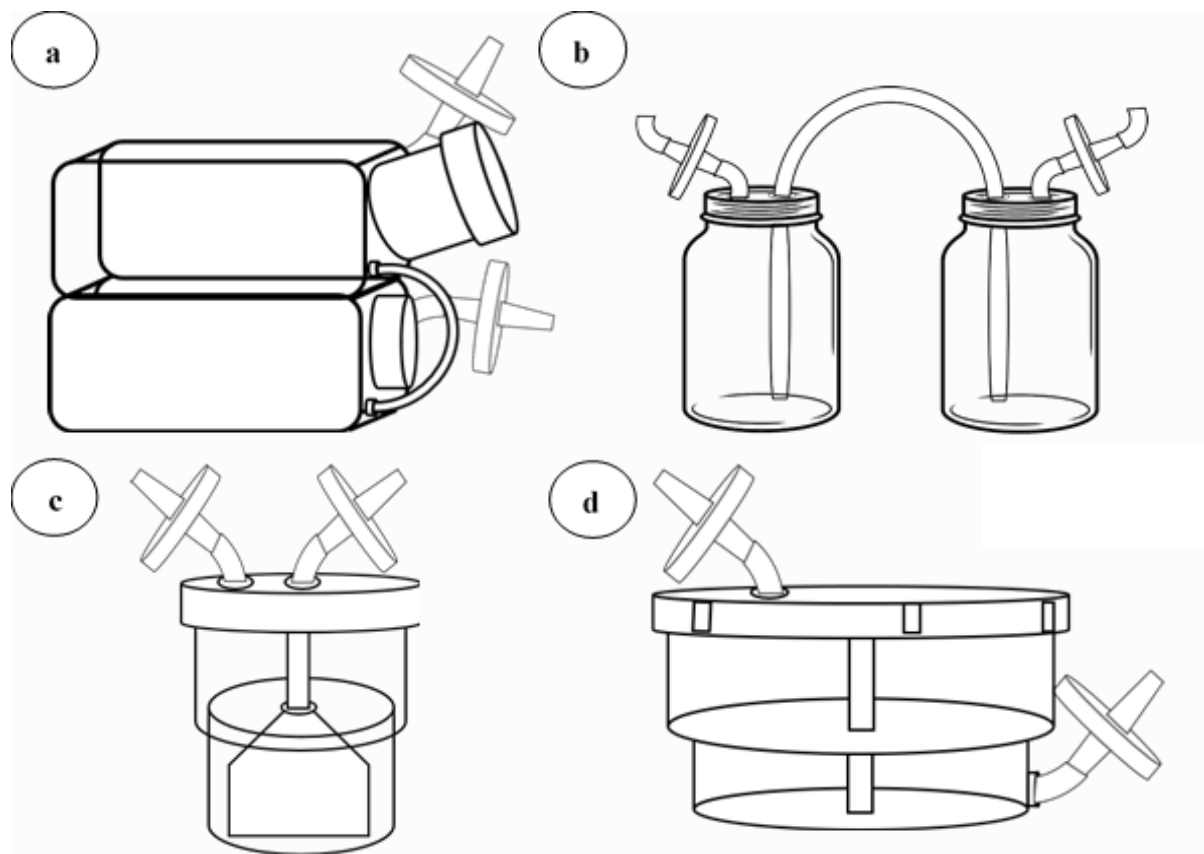
Etapa 3. Elongación y enraizamiento: en esta etapa se forma el sistema radicular, puesto que durante la etapa de multiplicación los brotes en su mayoría carecen de raíz, por lo tanto, poca probabilidad de adaptación *ex vitro*. La formación de raíces es favorecida por auxinas o carbón activado, de manera alternativa enraizamiento *in vivo* aplicando enraizador comercial y manteniendo una alta humedad relativa.

Etapa 4. Aclimatización: en esta etapa las plantas *in vitro* pasan a condiciones externas, para la cual deben tomarse en cuenta características importantes; humedad relativa alta, incremento paulatino en la intensidad luminosa, trabajar bajo condiciones higiénicas para el control de microorganismos.

A pesar de los beneficios de la micropropagación convencional en medios semisólidos, también implica altos costos de producción causados principalmente por la mano de obra, el uso de agentes gelificantes y la falta de automatización (Estrada-Martínez *et al.*, 2019). Debido a lo antes expuesto que se ha optado por usar sistemas semi automatizados para minimizar los costos de producción, aumentar las tasas de multiplicación y reducir la cantidad de manipulación, entre estos sistemas se encuentran los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT).

### **3.4 Sistemas de inmersión temporal (SIT)**

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) son sistemas automatizados simples, diseñados para el cultivo intensivo y en un entorno óptimo, mejorando la transferencia de nutrientes, gases y propiciando la formación de los brotes, brindando la máxima oportunidad para monitorear y controlar las condiciones ambientales estrechamente relacionadas con la comercialización de las plantas micropropagadas (Watt, 2012; Georgiev *et al.*, 2014). El uso de medio líquido durante la micropropagación, se considera la solución ideal para reducir los costos de producción e introducir la automatización (San José *et al.*, 2020). La frecuencia y duración de la inmersión, el volumen del medio líquido, el número de explantes, la aireación y la ventilación forzada son factores críticos para optimizar la técnica de micropropagación (Bello-Bello *et al.*, 2019). Existen diferentes modelos de SIT, por mencionar algunos: el Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA<sup>®</sup>, Alvard *et al.*, 1993), Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT<sup>®</sup>, Escalona *et al.*, 1999), Monobloc Advance Temporary Immersion System (MATIS<sup>®</sup>) (Etienne *et al.*, 2013) y Biorreactor SETIS<sup>™</sup> (Vervit, 2020) (Figura 2).



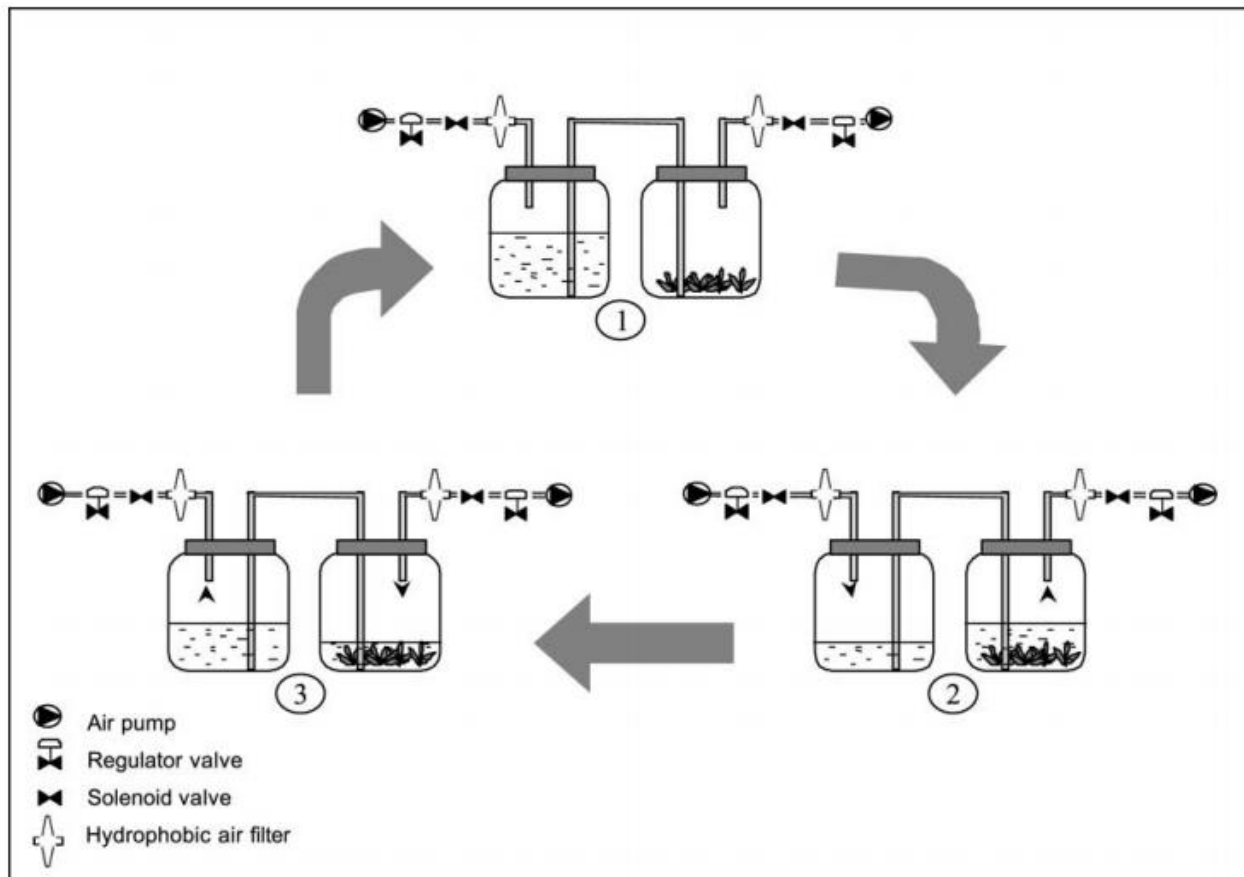
**Figura 2.** Modelos de sistemas de inmersión temporal (SIT). a) biorreactor SETISTM, b) Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT®), c) Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®), d) Monobloc Advance Temporary Immersion System (MATIS®).

### 3.4.1 Biorreactor de inmersión temporal (BIT)

El biorreactor de inmersión temporal BIT es un sistema de multiplicación rápido, económico y eficiente, que genera plantas de alta calidad (Escalona *et al.*, 2003) ya que promueve procesos fisiológicos tales como la fotosíntesis, la respiración, el desarrollo de la clorofila, y el funcionamiento de las estomas, lo que favorece el desarrollo durante el proceso de aclimatización (Lu y Merkle, 2020).

El BIT como se muestra en la Figura 3, está constituido por dos recipientes de vidrio transparente: uno para cultivo de plantas y otro como depósito para medio líquido. Los dos contenedores están conectados por tubos de silicona. En cada caso, el flujo de aire pasa a través de filtros hidrófobos

con el objetivo de mantener un sistema estéril dentro de los contenedores. La presión positiva de un compresor de aire empuja el medio de un recipiente a otro para sumergir las plantas por completo. El flujo de aire se invierte para retirar el medio del recipiente de cultivo. Los temporizadores electrónicos controlan la frecuencia y la duración del período de inmersión y las válvulas solenoide de tres vías con operación de encendido / apagado (Etienne *et al.*, 2013; Rivero *et al.*, 2018).



**Figura 3.** Funcionamiento del biorreactor de inmersión temporal (BIT). 1) los explantes y el medio de cultivo se encuentra de manera independiente, 2) el medio de cultivo pasa al frasco con los explantes, 3) después de un periodo de tiempo el medio de cultivo regresa a su frasco original (Escalona *et al.*, 2003).

### 3.4.2 BIT en caña de azúcar

La propagación *in vitro* de caña de azúcar es una alternativa de gran beneficio para obtener un número elevado de plantas en corto tiempo. Se ha potenciado la micropropagación de la caña de azúcar mediante el uso de SIT que mejoran la tasa de propagación, la calidad morfológica de los brotes y supervivencia *ex vitro* (Rivero *et al.*, 2020). Sin embargo, Estrada-Martínez *et al.* (2017) recomiendan hasta ocho subcultivos para la propagación *in vitro* de *Saccharum* spp. en IT, ya que a medida que aumenta el número de subcultivos, disminuye gradualmente el número de brotes y su longitud.

Da Silva *et al.* (2020) reportaron que el uso de BIT para la producción de plántulas de caña de azúcar, caña energética y otro germoplasma silvestre de caña de alta calidad, simplificando el método de micropropagación, ya que se produjeron en promedio, alrededor de 300 plántulas por biorreactor, las plántulas provenientes de biorreactores desarrollaron sistemas de raíces y presentaron una calidad superior en comparación con las enraizadas en sistemas con medio semisólido. Yang *et al.* (2020) reportó que incrementó la tasa de multiplicación a más de 40 veces en un subcultivo. Por otra parte, los altos contenidos de compuestos fenólicos durante la micropropagación con BIT en caña de azúcar han mejorado el desempeño de la planta durante su adaptación en condiciones *ex vitro* (Arencibia *et al.*, 2008), esto se debe a que la micropropagación de la caña de azúcar en BIT es rica en CO<sub>2</sub> lo que induce una condición mixotrófica adecuada para la producción de metabolitos fenólicos naturales (Bernal *et al.*, 2008).

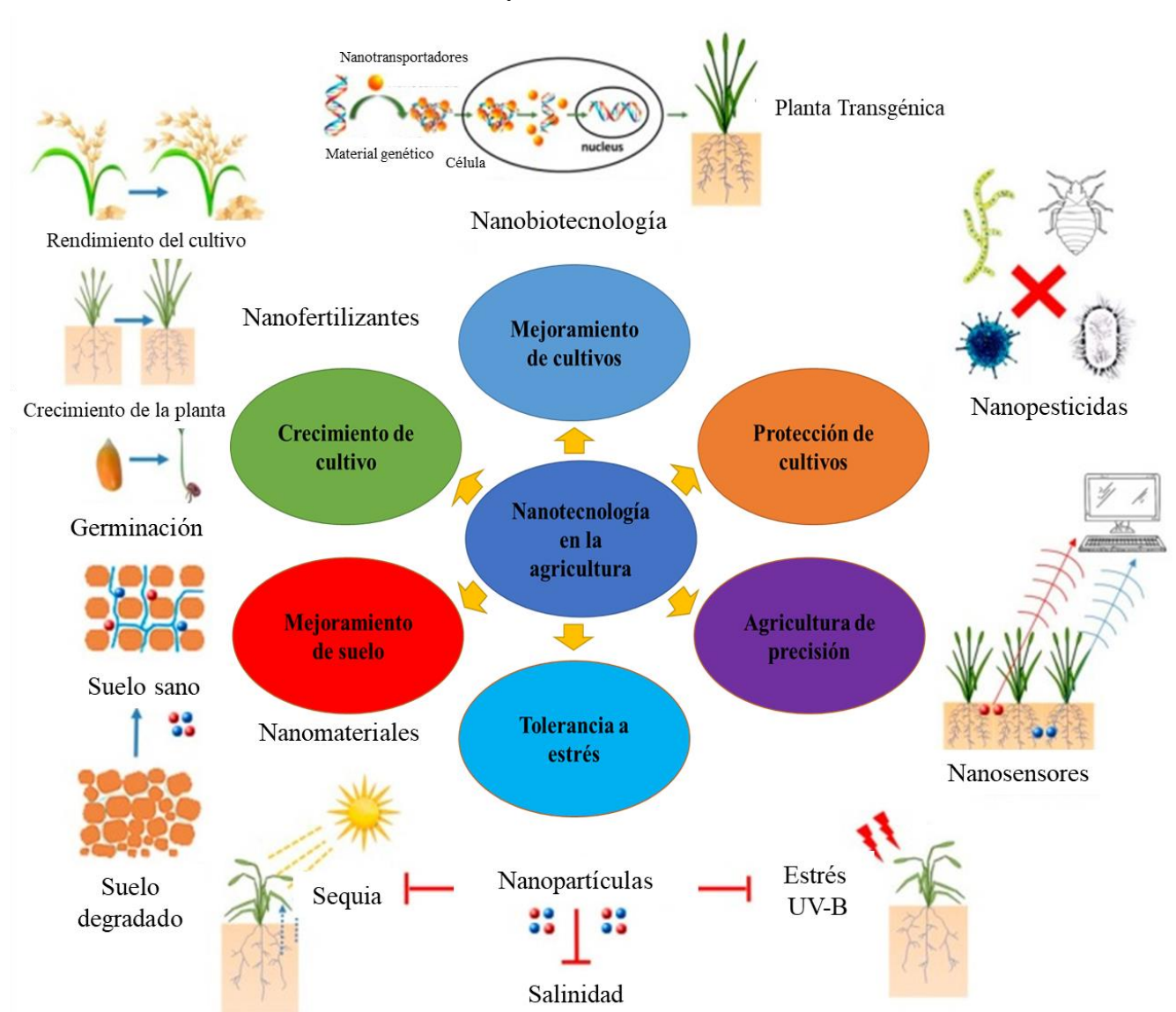
La micropropagación de caña de azúcar en BIT ha sido una herramienta para el estudio de nanomateriales como lo son las nanopartículas de plata (AgNP), mostrando diferencias significativas en la multiplicación y elongación de los brotes entre las dosis evaluadas (Bello-Bello *et al.*, 2017), es por eso que la micropropagación esta aliada con distintas tecnologías para mejorar su producción, la automatización ha facilitado los trabajos para la obtención de material vegetal, sin embargo, existe otras ciencias como la nanotecnología que ha convertido en una herramienta para las innovaciones tecnológicas.

### **3.5 Nanotecnología**

La nanotecnología es un área tecnológica que permiten la manipulación controlada, al estudio de estructuras y dispositivos con escalas de longitud en el rango de 1 a 100 nanómetros (McNeil,

2005; Bhushan, 2017). Las propiedades físicas y químicas únicas de los nanomateriales pueden explotarse para aplicaciones que beneficien a la sociedad (Lira *et al.*, 2018)

La nanotecnología ha traído grandes avances tecnológicos-científicos beneficiando a distintos sectores entre los que se encuentra el sector de la agricultura, beneficiándola en la detección de patógenos, mejorando la absorción de agua y nutrientes en las plantas. Las nanopartículas (NPs) son usadas para mejorar la eficiencia de los plaguicidas en el campo, reduciendo su volatilización, lixiviación, además de reducir la toxicidad y contaminación de los agroecosistemas (Shang *et al.*, 2020), en la figura 4 se muestran otros usos innovadores de las nanotecnologías en la agricultura beneficiando a la sostenibilidad alimentaria y ambiental.



**Figura 4.** Aplicaciones de la nanotecnología en agricultura (Shang *et al.*, 2019). Modificado a español.

Entre la línea reciente de innovaciones tecnológicas, la nanotecnología ocupa una posición prometedora en la agricultura y la producción de alimentos. La nanotecnología permite avances en la investigación agrícola, como la reproducción ciencia y tecnología (Taha *et al.*, 2016).

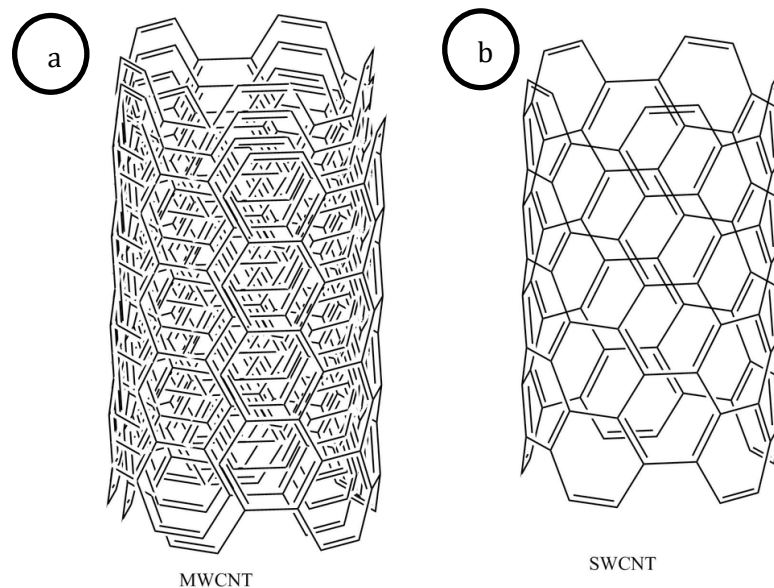
Los nanomateriales han sido utilizados en diferentes cultivos de interés agronómico, donde señalan que tienen efectos positivos en la germinación, así como en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las nanopartículas de plata (AgNP) en estevia (*Stevia rebaudiana*) promovió la producción de brotes y longitud por explante (Castro *et al.*, 2019) y reducción de contaminación en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) (Spinoso-Castillo *et al.*, 2017). Paret *et al.* (2013) reportaron que las partículas de óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) en escala nanométrica tiene efectos antimicrobianos, otro ejemplo es el uso de nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) que indujeron al crecimiento celular, la expresión de genes relacionados con la división celular (Cyc B), formación de la pared celular (NtLRX1) y transporte de agua (NtPIP1) (Khodakovskaya *et al.*, 2012).

Sin embargo; no existen reportes sobre su uso de los nanomateriales como lo son los nanotubos de carbono en el cultivo *in vitro* de caña de azúcar.

### **3.6 Nanotubos de carbono (NTCS)**

Los nanotubos de carbono son estructuras cilíndricas de diámetro nanométrico, su observación experimental empezó en 1991 por Iijima, aunque los primeros trabajos fueron llamados nanotubos de carbono de paredes múltiples, fue hasta 1993 el descubrimiento de nanotubos de carbono de pared simple (Dresselhaus *et al.*, 1995; Popov, 2004). Se ha demostrado que los nanomateriales son de gran importancia debido a sus propiedades térmicas, mecánicas, eléctricas, y químicas (Martínez-Ballesta *et al.*, 2017).

La estructura de los NTC de pared simple y pared múltiple (Figura 5) consta de enlaces puros de carbono unidos por un enlace covalente híbrido  $sp^2$ , están formados por el ángulo de enrollamiento respecto a los hexágonos formados por los enlaces de carbono (Baladrán-Quintana *et al.*, 2008).



**Figura 5.** Estructura de los nanotubos de carbono, a) nanotubos de carbono de pared múltiple b) nanotubos de carbono de pared simple.

Los nanotubos de carbono de pared simple están compuestos por una hoja enrollada de grafeno, mientras que los nanotubos de carbono de paredes múltiples están compuestos por varias hojas de grafeno enrolladas en cilindros concéntricos (Ahmad y Silva, 2020; Paramo *et al.*, 2020). Los nanotubos de carbono (NTC) tienen algunas propiedades físicas lo que le otorga usos potenciales en multitud de campos (Shoukat y Khan, 2021), pero la investigación de sus efectos en las plantas es muy escasa, por lo tanto, es necesario investigar a fondo la interacción con las plantas.

### 3.6.1 Los nanotubos de carbono en la agricultura

La agricultura ha jugado un papel clave en el desarrollo de la civilización humana, el sector agrícola se enfrenta desafíos globales; cambio climático, baja productividad, pérdida de fertilidad del suelo, deficiencia de macro y micronutrientes, reducción de tierras agrícolas y reducción en la



disponibilidad agua, cuestiones relacionadas con el medio ambiente como el aumento de residuos de plaguicidas (Acharya *et al.*, 2020).

La nanobiotecnología y la nano agricultura con las investigaciones que incluyen los nanomateriales de carbono causan efectos en el manejo agrícola de los cultivos. Liné *et al.*, (2021) reportaron impactos positivos en colza (*Brassica napus*) en donde se observó el aumento de más del 50% en la biomasa foliar y la superficie área, mientras que la clorofila tuvo un aumento de 29 % en plantas de pepino *Cucumis sativus*).

Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que los nanotubos de carbono, a bajas concentraciones, estimulan el desarrollo vegetal, también llamado efecto hormético u hormesis. La hormesis se refiere a un fenómeno de dosis-respuesta caracterizado por una estimulación a dosis baja y una inhibición a dosis alta (Agathokleous *et al.*, 2019). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) están asociadas a la hormesis debido a que son moléculas de señalización que desencadenan diferentes procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares sobre el desarrollo vegetal; sin embargo, la producción y acumulación en exceso de ROS resulta tóxico para los tejidos vegetales (Jalal *et al.*, 2021). Los nanotubos de carbono, a altas concentraciones, pueden inducir estrés oxidativo, por lo tanto, la producción de ROS, que en altas concentraciones ocasionando una disminución de la proliferación celular, lo que eventualmente conduce a la muerte celular (Tan *et al.*, 2009). De acuerdo a Majeed *et al.*, (2020), los nanotubos de carbono tienen efecto el alargamiento de las raíces, crecimiento temprano, aumento de la biomasa, cambios en las funciones metabólicas y desarrollo de la planta (Majeed *et al.*, 2020); sin embargo, esto depende de la concentración utilizada y sensibilidad en cada especie (Sadami *et al.*, 2021). Se ha reportado que los nanotubos de carbono, a bajas concentraciones, tiene efectos positivos durante el desarrollo en especies como satureja (*Satureja khuzestanica*), mostaza (*Sinapis alba*), albahaca (*Ocimum basilicum*) (Ghorbanpour y Hadian, 2015; Polischchuk *et al.*, 2020; Gohari *et al.*, 2020). Esta relación entre la concentración de NTCPM y la respuesta de la planta, está relacionada con el efecto hormético.

Aunque estos efectos se han demostrado para diferentes especies, los mecanismos subyacentes y las implicaciones para la seguridad alimentaria deben recibir rigurosas investigaciones. La mayoría de los estudios centrados en el efecto de los NTC de pared múltiple en el crecimiento y desarrollo de las plantas, se han utilizado con cultivos en suelos, medios de cultivo hidropónicos o agar como

sustratos de crecimiento (Zaytseva y Neumann, 2016). Su uso en cultivo de tejidos vegetales podría mejorar el estudio para conocer los efectos que tiene sobre los distintos tejidos.

### 3.6.3 Los nanotubos de carbono en cultivo de tejidos vegetales

Los nanotubos de carbono han sido estudiados principalmente con la ayuda del cultivo de tejidos vegetales, ya que se pueden estudiar bajo condiciones controladas los efectos que estos tienen sobre los diferentes cultivos.

En la Tabla 2 se exponen algunos estudios sobre los efectos positivos que tienen los nanotubos de carbono de pared múltiple.

**Tabla 2.** Estudios que demuestran los efectos positivos de los nanotubos de carbono de pared múltiple plantas *in vitro*.

Tipo de Nanotubos	Características	Planta modelo	Resultados	Referencia
NTCPM	Pureza del 98% a base de carbono	Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Penetrabilidad de los NTC en la testa de la semilla. Aumentó de la tasa de germinación y crecimiento.	(Khodakovskaya <i>et al.</i> , 2009)
NTCPM	Pureza del 99% a base de carbono, OD 9 Longitud 6–13 nm 9 2,5–20 μm	Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	Se observó mayor crecimiento de raíz y biomasa vegetativa.	(Wang <i>et al.</i> , 2012)

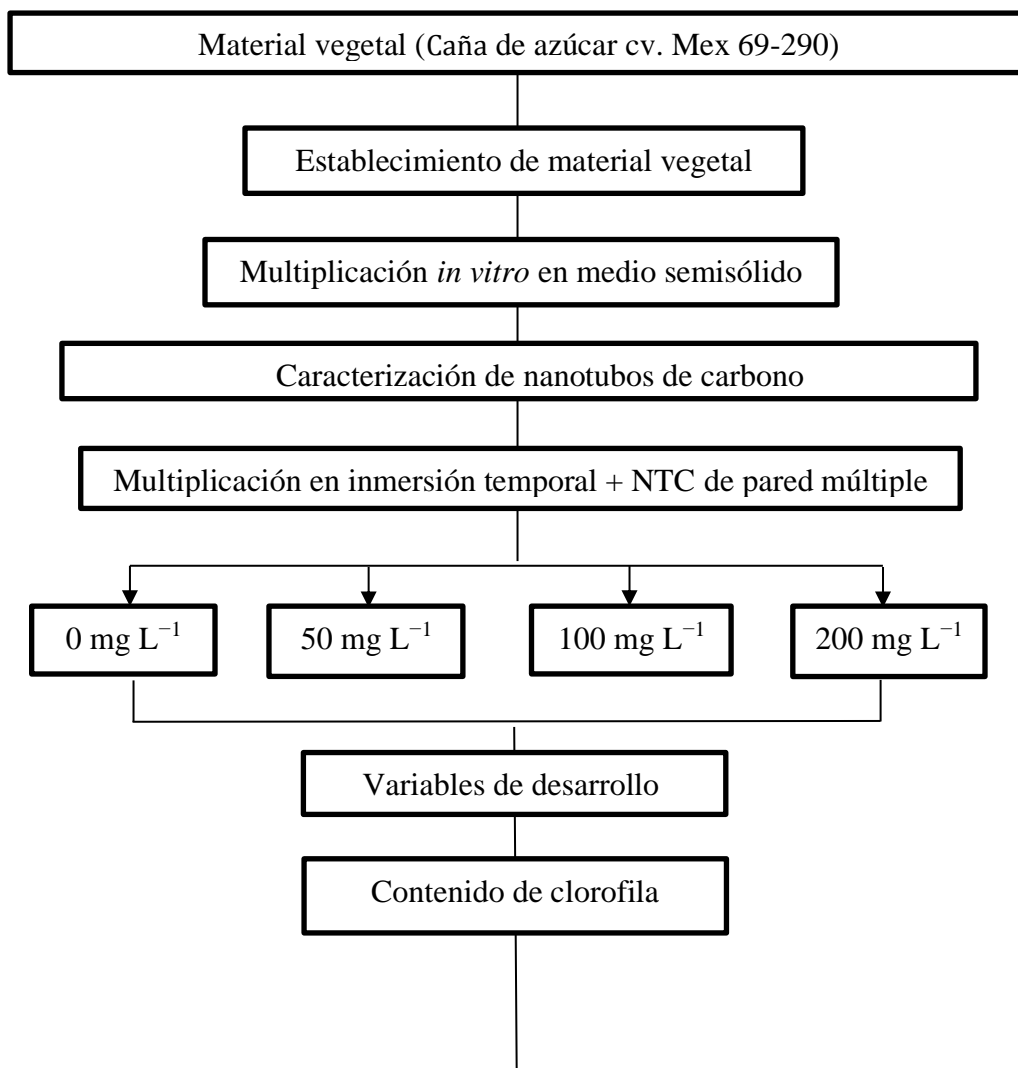
NTCPM	Pureza de ~97%, diámetro promedio de 20 nm y longitudes que requerían 500 nm a 1 µm	Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	Los NTCPM tienen la capacidad de mejorar el crecimiento del cultivo de células de tabaco (aumento del 55-64% sobre el control) y la regulación positiva de los genes involucrados en la división celular / formación de la pared celular y el transporte de agua.	(Khodakovskaya <i>et al.</i> , 2012)
NTCPM	Diámetros en un rango de 15 a 40 nm	Cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> ) Maíz ( <i>Zea mays</i> ) Soya ( <i>Glycine max</i> )	Estimula la expresión de genes del canal de agua (acuaporinas) que juegan un papel crítico en germinación de semillas.	(Lahiani <i>et al.</i> , 2013)
NTCPM	Pureza > 95% a base de carbono, DO 6-9 nm, L 5 µm.	Maíz ( <i>Zea mays</i> )	Mejora la germinación de las plántulas en concentraciones bajas, pero lo reduce en concentraciones más altas.	(Tiwari <i>et al.</i> , 2014)
NTCPM	Diámetro 110–170 nm, longitud 5–9 µm	Palma ( <i>Heliconia chartacea</i> cv. Sewy)	En la etapa de embriogénesis, los NTC aumentaron el número de embriones germinados, número de raíces y mejoraron significativamente la longitud de los brotes y el número de hojas en la etapa de alargamiento.	(Taha <i>et al.</i> , 2016)

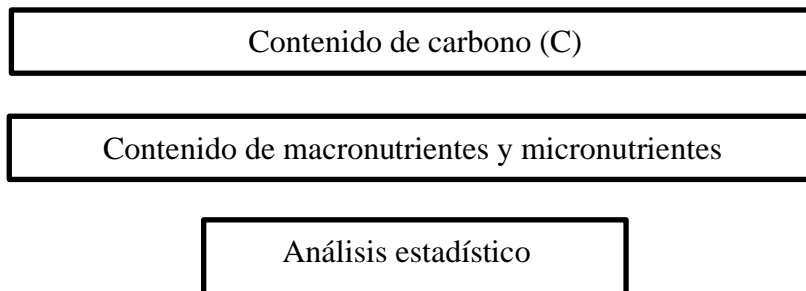
## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Ubicación del área de trabajo

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Colegio de Postgraduados campus Córdoba, Ver. Coordenadas, 18° 51' 20'' Norte, 97° 8' 23'' Oeste.

### 4.2 Estrategia experimental





### **4.3 Caracterización de nanotubos de carbono de pared múltiple**

Se utilizaron nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM), (CAS: 308068-56-6) (Sigma-Aldrich® Chemical Company, MO, USA). Los nanotubos (1 mg de NTCPM) fueron disueltos en 1 mL de isopropanol (Sigma-Aldrich®) y dispersados en dos ciclos de agitación de 10 minutos (Super Mixer, LAB LINE; Melrose Park, IL, USA) y 2 ciclos de sonicación (Ultrasonic equipment, PS-20A, Shenzhen Jie Tai Co., LTD; Guangdong, China) a 40 KHz, por 10 min a 25 °C. La caracterización morfológica de los nanotubos fue realizada en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) (Morgagni M-268, Philips/FEI, EI, NL). La muestra de NTCPM fue tomada en una alícuota de 5 µL (1 mg de NTCPM /10 mL y depositadas en una rejilla de cobre con malla 200 mesh recubiertas con formvar/carbón. El secado de la muestra se realizó a temperatura ambiente por 5 min. Las condiciones de operación del microscopio fue alto voltaje de 80 Kv (HV), en baja magnificación a 14,000X y alta magnificación a 200,000X, presión de trabajo de la columna:  $5 \times 10^{-3}$  Pa ( $5 \times 10^{-5}$  Torr). Todas las micrografías fueron capturadas en formato .tiff con un tamaño de 1376x1032 pixeles en formato de escala de grises.

### **4.4 Establecimiento de explantes caña de azúcar *in vitro***

Para el establecimiento de los cultivos *in vitro* se colectó el ápice de un tamaño aproximado de 30 cm provenientes de plantas de cuatro meses de edad. Los ápices se redujeron a una longitud de 15 cm y se colocaron en termo hidroterapia en un baño termostático con circulación (Ecoshel, SC-15; TX, USA) a 50 °C durante 20 min. Posteriormente, en una campana de flujo laminar los ápices se redujeron a 1.5 cm, se enjuagaron durante cinco minutos en una solución al 10% (v/v) de cloro comercial Cloralex™ (Industrias Alen, S.A. de C.V.; NL, México) (5% de i.a.) con tres gotas de

Tween 20<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) por cada 100 mL de agua. Los ápices se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Finalmente, los explantes se colocaron individualmente en tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa sin reguladores de crecimiento. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8, se añadió 0.25% (w/v) Phytigel<sup>™</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) como agente gelificante y se esterilizó en la autoclave durante 15 min a 120 °C y 115 kPa. Los explantes se incubaron a 24 ± 2 °C, bajo irradiancia de 40 ± 5 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y un fotoperiodo de 16 h de luz. Después de una semana de cultivo, los ápices se transfirieron para la fase de multiplicación a medio MS suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> sacarosa, 1 mg L<sup>-1</sup> kinetina (KIN), 0.6 mg L<sup>-1</sup> Ácido indoloacético (AIA) y 0.6 mg L<sup>-1</sup> Bencilaminopurina (BAP). Todos los reactivos fueron Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. Después de tres subcultivos (30 d cada uno) en fase de multiplicación en medio semisólido, se tomaron brotes como fuente de explante para los experimentos con NTCPM

#### **4.5 Aplicación de nanotubos de carbono en cultivos *in vitro***

Para la multiplicación *in vitro* se utilizó medio líquido MS de multiplicación. Los NTCPM fueron administrados al medio de cultivo líquido en diferentes concentraciones (0, 50, 100, 200 mg L<sup>-1</sup>). Se emplearon biorreactores de inmersión temporal con capacidad de 1000 mL, se aforaron a 500 mL de medio de cultivo y se esterilizaron a 120 °C por 20 minutos. Se utilizaron 10 explantes por frasco los cuales se cortaron de dos brotes fusionados de la base con longitud de 2 cm. El tiempo de inmersión fue de 2 min cada 8 h durante 30 días. Las condiciones de incubación fueron las mismas descritas anteriormente.

#### **4.6 Evaluación del contenido de macro y micronutrientos**

Para determinar el contenido de macro y micronutrientos, las muestras se secaron a 70 °C en una estufa de secado por 72 h y fueron pulverizadas en un blender (Oster 6832, MKE, WI, USA). Las muestras se sometieron a una digestión húmeda en una mezcla de ácidos perclórico y nítrico en relación 2:1 (v/v), de acuerdo el protocolo descrito por Alcántar y Sandoval (1999). Para determinar las concentraciones de macronutrientos (P, K, Ca, Mg y S) y micronutrientos (B, Cu, Fe, Mn, Ni y Zn), los extractos fueron analizados por espectrometría de emisión óptica de inducción por plasma acoplado (ICP-OES, Varian 725-ES, Agilent; Mulgrave, Australia). La

concentración de N se determinó mediante el método semi-microkjeldahl de acuerdo al protocolo descrito por Bremner (1965).

#### **4.7 Cuantificación del contenido de carbono**

El contenido de C se determinó según el método de Walkley-Black (1934). Muestras de 100 mg de cada tratamiento fueron sometidas a una digestión en una mezcla de 10 mL de dicromato de potasio 1 N y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado 0.1 N. Posteriormente, la mezcla se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 mL y fue agitado manualmente por 1 min. La cuantificación de C se realizó por titulación con sulfato ferroso heptahidratado 0.05 N.

#### **4.8 Contenido de clorofila**

El contenido de clorofila total se determinó según la metodología propuesta por Harborne (1973). Para cada muestra se macero 1 g de materia fresca con acetona al 80% y se dejó reposar a  $-4^{\circ}$  C por 24 h en acetona 80 % a un volumen final de 10 ml. Posteriormente, la mezcla se filtró con papel filtro No. 41, se ajustó a un volumen de 25 mL con acetona al 80%. Se utilizaron 2 mL por muestra a una absorbancia de 663 y 645 nm para clorofila a y b, respectivamente. Las lecturas se realizaron utilizando un espectrofotómetro (Genesys 10S, Thermo Scientific; MA, USA). Finalmente se realizó la cuantificación utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila total} = [(8.20 * A_{663}) - (20.20 * A_{645})] (V) / (1000 * W)$$

Donde  $A_{645}$  y  $A_{663}$ : absorbancia,  $V$ : volumen de graduación en  $\text{mL}^{-1}$ ,  $W$ : peso de la muestra en g y 1000 es el factor de conversión.

#### **4.9 Diseño experimental y análisis estadístico**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía y comparación de medias por Tukey ( $p \leq 0.05$ ) utilizando el software estadístico IBM SPSS® (versión. 22 para Windows).

## 5. RESULTADOS

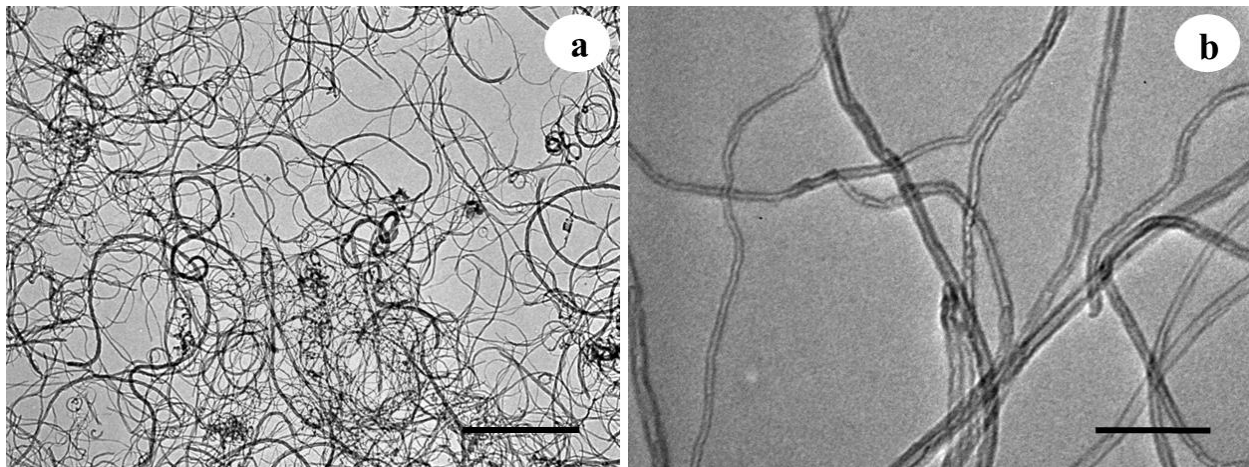
### 5.1 Características de los nanotubos de carbono

La caracterización fisicoquímica de los NTCPM se muestra en la Tabla 3, su formulación es a base de polvo y con una pureza de carbono de 98%. La caracterización por MET corrobora las dimensiones de fabricación, con un diámetro exterior de entre 6-13 nm y longitud promedio de entre 2.5-20  $\mu\text{m}$  (Figura 6).

**Tabla 3.** Características fisicoquímicas de los nanotubos de carbono de pared múltiple

<b>Propiedad</b>	<b>Descripción</b>
Pureza	> 98% de base de carbono
Formulación	Polvo
Composición	Carbono, > 98% (impurezas totales de metales)
Diámetro/longitud	6-13 nm $\times$ 2.5-20 $\mu\text{m}$
Preparación	Deposición química de vapor



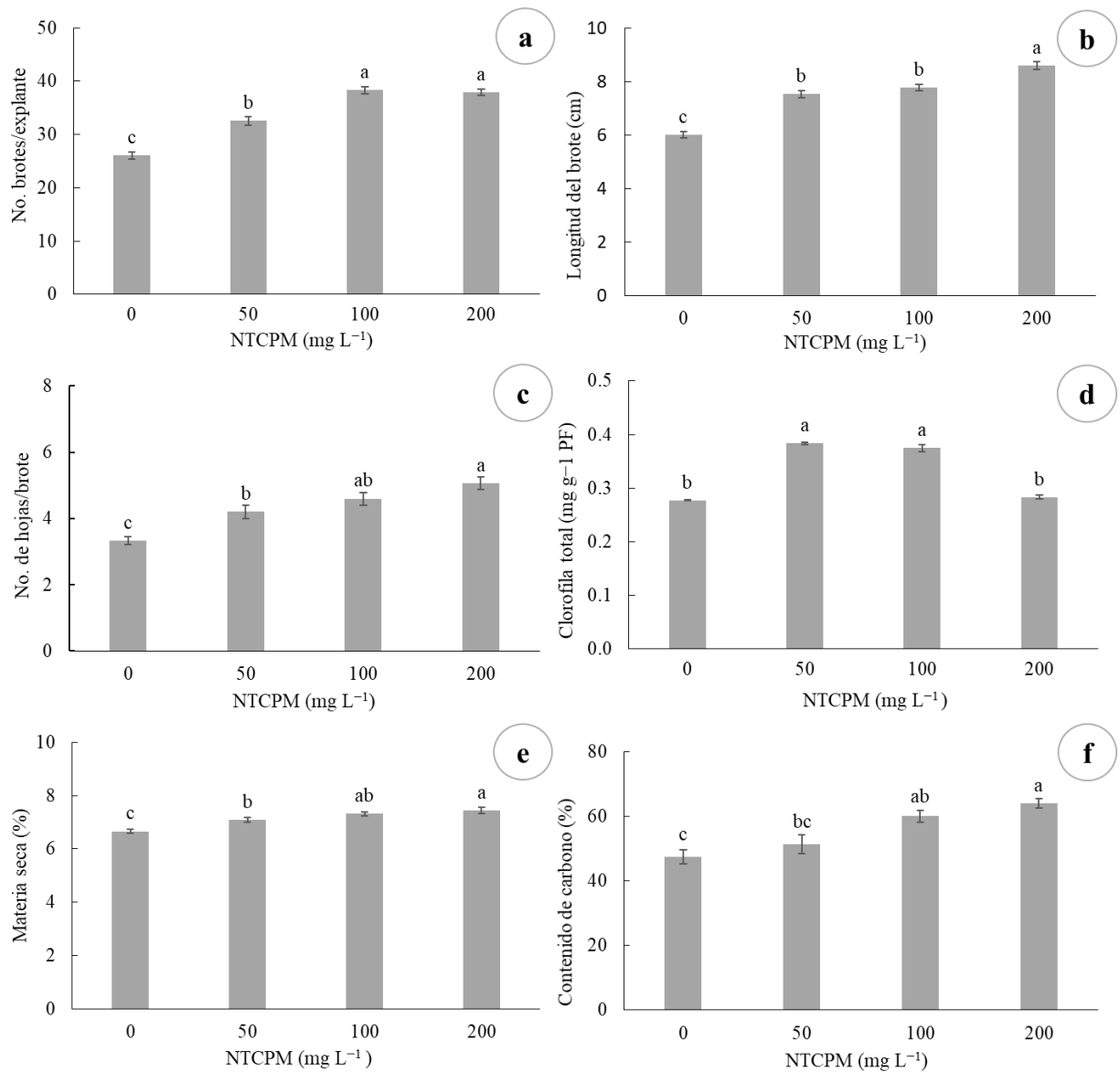


**Figura 6.** Nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) observados por microscopía electrónica de transmisión (MET) usando diferentes magnificaciones, a) Barra negra 1000 nm, b) Barra negra = 100 nm.

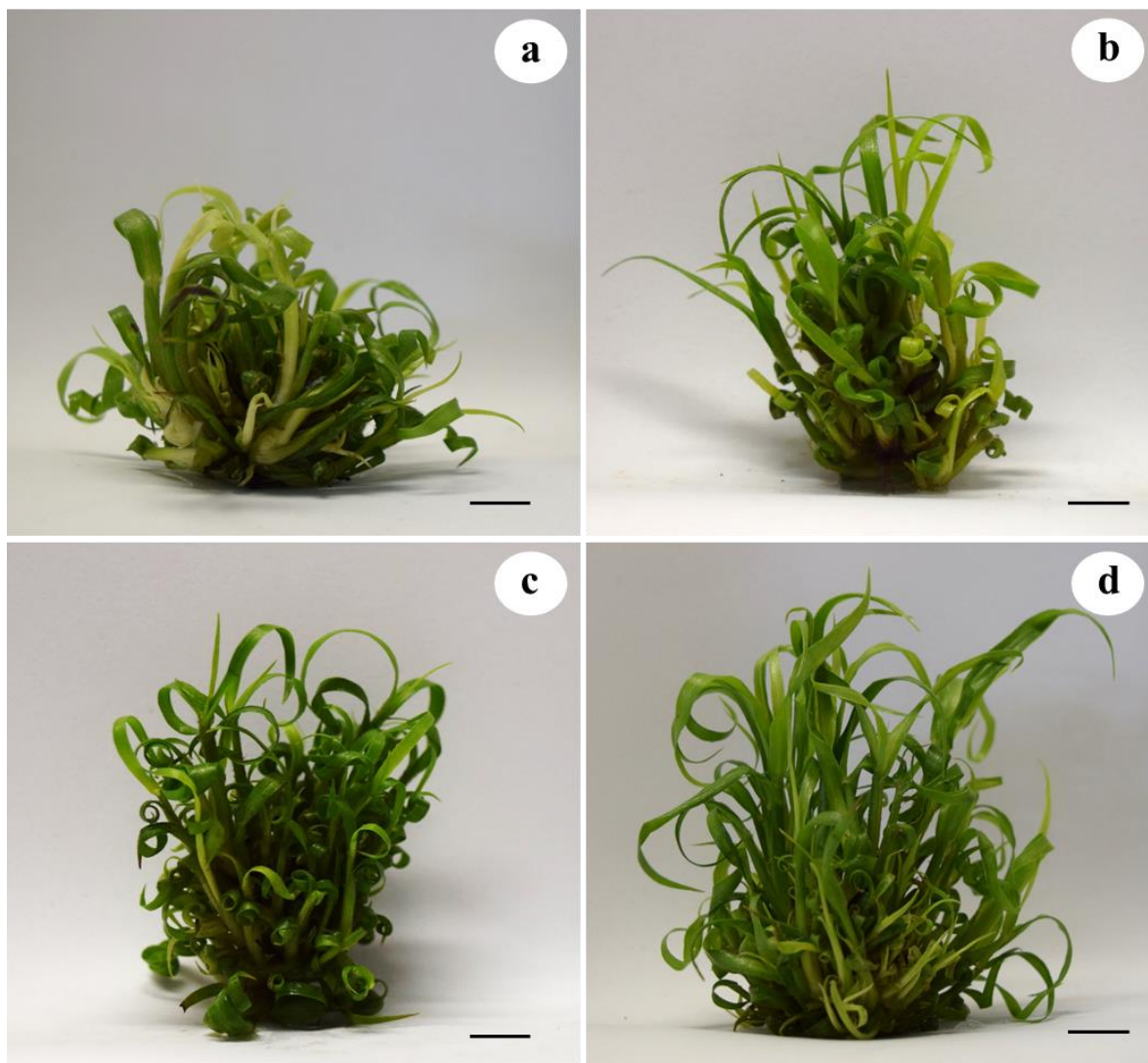
### **5.2 Efecto de nanotubos de carbono pared múltiple en el desarrollo de brotes, contenido de clorofila y carbono**

La administración de diferentes concentraciones de NTCPM tuvo un efecto contrastante sobre el número de brotes por explante, longitud de brote, número de hojas por brote, contenido de clorofila, porcentaje de materia seca y porcentaje de carbono en brotes de caña de azúcar cultivados en BIT (Figura 7). La mayor cantidad de brotes se obtuvo en las concentraciones de 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con 38.33 y 37.93 brotes por explante, respectivamente; mientras que, la menor cantidad de brotes se observó en el tratamiento control, con 26.06 brotes por explante (Figura 7a). Respecto a la longitud de brote, la mayor altura de brotes se observó en el tratamiento con 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con 8.61 cm de longitud; mientras que la menor longitud se observó en el tratamiento control, con 6.01 cm de altura (Figura 7b). La mayor cantidad de hojas por brote se observó en las concentraciones de 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con 4.6 y 5.06, respectivamente; mientras que, la menor cantidad de hojas se obtuvo en el tratamiento control, con 3.33 de hojas por brote (Figura 7c). Para el contenido de clorofila, el mayor contenido de clorofila se observó en los tratamientos con 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con 0.38 y 0.37 mg g<sup>-1</sup> FW, respectivamente; mientras que, el menor contenido de clorofila se observó en los tratamientos con 0 y 200 mg L<sup>-1</sup>

de NTCPM con 0.27 y 0.28 mg g<sup>-1</sup> FW, respectivamente (Figura 7d). Por otra parte, para el porcentaje de materia seca, el mayor contenido de materia seca se observó en los tratamientos con 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con 7.31 y 7.44% de materia seca, respectivamente; mientras que, el menor contenido se observó en el tratamiento control, con 6.65% de materia seca (Figura 7e). Para el porcentaje de carbono se obtuvieron los mayores porcentajes en las concentraciones de 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM con 60.00 y 64.07%, respectivamente; mientras que, el menor contenido de carbono se obtuvo en las concentraciones de 0 y 50 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con 47.39 y 51.25% de carbono, respectivamente (Figura 7f).



**Figura 7.** Efecto de los nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) en el desarrollo de brotes, contenido de clorofila y carbono de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) cv. Mex 69-290 cultivadas *in vitro* en inmersión temporal. **a)** brotes por explante, **b)** longitud de brote, **c)** hojas por brote, **d)** clorofila total, **e)** materia seca y **f)** contenido de carbono a los 30 días de cultivo. Los valores representan la media  $\pm$  ES (error estándar). Medias con diferente letra, son significativamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 8.** Efecto de diferentes concentraciones de NTCPM en el desarrollo de brotes *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) cv. Mex 69-290 a los 30 días en inmersión temporal; **a-d**) 0, 50, 100, y 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, respectivamente. Barra = 1 cm.

### **5.3 Efecto de los nanotubos de carbono sobre el contenido de macro y micronutrientes**

Se observó un efecto significativo de los NTCPM sobre el contenido de macroelementos N, Ca, y S, así como en los micronutrientes Fe, Cu, Zn y Na (Tabla 4). Los mayores contenidos de N se observaron a concentraciones de 0, 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con 4.79, 4.58 y 4.24%, mientras que el menor contenido se encontró en la concentración de 200 mg L<sup>-1</sup>, con 3.95%. Para el elemento Ca el mayor contenido se observó en el tratamiento de 200 mg L<sup>-1</sup> seguido del

tratamiento a 100 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con 1848 y 1627 mg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente; mientras que, el menor contenido de Ca fue en 0 y 50 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con 1425.42 y 1561.81 mg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Para el macronutriente S, los mayores contenidos se obtuvieron en los tratamientos a 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con valores de 3267.52 y 3487.07 mg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente; mientras que el menor contenido de S se observó en el tratamiento sin NTCPM, con 3032.37 mg Kg<sup>-1</sup>. Respecto a los micronutrientes, los mayores contenidos de Fe fueron en los tratamientos 0, 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con 299.49, 318.00 y 322.49 mg Kg<sup>-1</sup>, mientras que el menor contenido de Fe se encontró en el tratamiento con 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con 281.86 mg Kg<sup>-1</sup>. Para el micronutriente Cu, el mayor contenido se observó en el tratamiento control, con 6.41 mg Kg<sup>-1</sup>, mientras el contenido más bajo de Cu se observó en los brotes tratados con 100 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con valores entre 3.22- 3.39 mg Kg<sup>-1</sup>. Para el elemento Zn, los contenidos más altos fueron en los tratamientos 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con 74.45 y 76.65 mg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente; mientras que, el menor contenido fue en 0 y 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con 69.73 y 68.98 mg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Finalmente, el mayor contenido de Na se observó en brotes tratados con 0 y 50 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, con 508.29 y 515.24 mg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente; mientras que, los menores contenidos se observaron en las concentraciones de 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> NTCPM, con 322.45 y 352.95 mg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Tabla 4.** Efecto de nanotubos de carbono de pared múltiple sobre el contenido de macro y micronutrientes de brotes *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) cv. Mex 69-290 en inmersión temporal.

NTCPM (mg L <sup>-1</sup> )	Macronutrientes (mg Kg <sup>-1</sup> )						
	N (%)	P	K	Ca	Mg	S	
0	4.79±0.13 <sup>a</sup>	3288.13±63.92 <sup>a</sup>	39156.96±3609.36 <sup>a</sup>	1425.42±25.07 <sup>b</sup>	1006.97±20.32 <sup>a</sup>	3032.37±72.02 <sup>b</sup>	
50	4.58±0.14 <sup>a</sup>	3172.63±84.08 <sup>a</sup>	39263.50±4270.20 <sup>a</sup>	1561.81±14.68 <sup>b</sup>	1008.41±16.54 <sup>a</sup>	3267.52±13.44 <sup>ab</sup>	
100	4.24±0.15 <sup>ab</sup>	3170.66±126.87 <sup>a</sup>	36006.56±3114.44 <sup>a</sup>	1627.85±60.79 <sup>ab</sup>	1006.35±8.31 <sup>a</sup>	3549.03±69.46 <sup>a</sup>	
200	3.95±0.16 <sup>b</sup>	3304.98±108.87 <sup>a</sup>	36434.70±4068.33 <sup>a</sup>	1848.00±70.56 <sup>a</sup>	1051.42±27.62 <sup>a</sup>	3487.07±122.15 <sup>a</sup>	
	Micronutrientes (mg Kg <sup>-1</sup> )						
	Fe	Cu	Zn	Mn	B	Ni	Na
0	299.49±7.04 <sup>ab</sup>	6.41±0.38 <sup>a</sup>	69.73±0.25 <sup>b</sup>	62.04±0.86 <sup>a</sup>	20.75±0.43 <sup>a</sup>	1.42±0.26 <sup>a</sup>	508.29±10.86 <sup>a</sup>
50	318.00±3.79 <sup>a</sup>	3.32±0.35 <sup>b</sup>	74.45±0.93 <sup>ab</sup>	62.89±0.64 <sup>a</sup>	20.17±0.64 <sup>a</sup>	2.11±0.50 <sup>a</sup>	515.24±9.16 <sup>a</sup>
100	322.49±2.45 <sup>a</sup>	3.22±0.17 <sup>b</sup>	76.65±0.44 <sup>a</sup>	61.39±0.42 <sup>a</sup>	20.20±0.29 <sup>a</sup>	1.58±0.90 <sup>a</sup>	322.45±1.50 <sup>b</sup>
200	281.86±10.04 <sup>b</sup>	3.39±0.02 <sup>b</sup>	68.98±2.61 <sup>b</sup>	64.65±2.61 <sup>a</sup>	22.45±0.93 <sup>a</sup>	2.51±0.79 <sup>a</sup>	352.95±16.30 <sup>b</sup>

Los valores representan la media ± ES (error estándar). Medias con diferente letra, son significativamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Desarrollo vegetal y contenido de carbono

En este estudio se demuestran el efecto de los NTCPM durante la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar. El incremento en la tasa de multiplicación, longitud de brote y número de hojas a concentraciones de 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM podría deberse a una mayor absorción de nutrimentos y compuestos orgánicos como la sacarosa, reguladores del crecimiento, vitaminas, entre otros. Al respecto, Khodakovskaya *et al.* (2012) en callo de tabaco (*Nicotina tabacum*) *in vitro* observaron un incremento en la biomasa entre 55% - 64% en un rango de concentraciones de 5-500 µg mL<sup>-1</sup> de NTCPM. Pandey *et al.* (2018) en semillas de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) y pasto varilla (*Panicum virgatum*) *in vitro* lograron aumentar el porcentaje de germinación y longitud del brote en la concentración de 200 µg mL<sup>-1</sup> de NTCPM. De manera similar, Seddighinia *et al.* (2019) en melón amargo (*Momordica charantia*) obtuvieron un mayor desarrollo en longitud de brote y raíz, contenido de biomasa fresca y seca durante la germinación en 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM. Esto sugiere una internalización de los nanotubos de carbono en los tejidos que contribuyen también al aumento en % PS. Yousefi *et al.* (2017) en Hopbush (*Dodonaea viscosa* L.) reportaron que los NTCPM incrementaron el porcentaje de germinación de semillas, así como el peso fresco y seco de raíces y tallos en concentraciones entre 10 y 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM. Samadi *et al.* (2020) en tomillo (*Thymus daenensis* celak) *in vitro* reportaron aumento el peso fresco y seco de los tallos mientras que su altura fue tres veces mayor que el control en plántulas desarrolladas con 250 µg mL<sup>-1</sup> de NTCPM; sin embargo, las concentraciones de 500-2000 µg mL<sup>-1</sup> de NTCPM, tuvieron efecto negativo sobre su desarrollo.

En este estudio, el incremento en el peso seco se presentó como respuesta al incremento de la concentración de NTCPM adicionados al medio de cultivo, probablemente se debe a una mayor acumulación de compuestos orgánicos e inorgánicos que son transportados en los tejidos por los NTCPM. La mayor fuente de carbono fue suministrada en forma de sacarosa y otros compuestos orgánicos en el medio de cultivo MS (glicina, mio-inositol, ácido nicotínico, pyrodoxina, tiamina), reguladores de crecimiento KIN, AIA, BAP y por el contenido de C de

los tratamientos con NTCPM. El incremento del porcentaje de C total esta relaciona con el incremento de la concentración de NTCPM.

## 6.2 Contenido de clorofila

El incremento del contenido de clorofila en las concentraciones de 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM está relacionado a una mayor actividad fotosintética. Al respecto, Sun *et al.* (2020) y López-Vargas *et al.* (2020), mencionan que los NTC tienen la capacidad de moverse a través de los tejidos formando poros vía apoplástica y vía endocitosis hasta llegar a las células del mesófilo en hojas, especialmente dentro de los cloroplastos afectando la actividad fotosintética mediante la captura de carbono para uso de energía y transporte de electrones. Ghasempour *et al.* (2019) en vinca (*Catharanthus roseus*) *in vitro*, en concentración de 50 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM tuvieron la mayor cantidad de biomasa y en concentraciones de 100 y 150 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM observaron un aumento en el contenido de clorofila. Rahmani *et al.* (2020) en salvia (*Salvia verticillata*) observaron aumento en el contenido de clorofila en concentración de 50 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM.

## 6.3 Contenido de macro y micronutrientos

Los NTCPM tuvieron efecto sobre el contenido de algunos macros y micronutrientos en los brotes de caña de azúcar cultivados *in vitro*. Al aumentar las concentraciones de NTCPM se observó una tendencia a incrementar del número de brotes por explante, longitud y número de hojas por brote. El aumento en la actividad propagativa pudiera estar asociado por una mayor absorción de N, Ca, S, Fe y Zn; sin embargo, el bajo contenido de N, Fe y Zn en concentración de 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM podría explicarse debido a diferentes hipótesis: 1) un posible agotamiento de estos elementos en el medio de cultivo que fue utilizado durante las primeras etapas de desarrollo de los brotes, 2) debido a mayor difusión ocasionado por un factor de dilución de estos elementos ocasionado por una mayor longitud y número de hojas por brote y/o 3) debido a un intercambio de iones a través de los NTCPM ocasionado por un gradiente de concentración tanto del interior como al exterior de la células. Este hecho podría explicar también el bajo contenido de clorofila en la concentración de 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, probablemente asociado a una baja cantidad de N y Fe, nutrientes en la síntesis de clorofila. Resultados similares fueron reportados por Hao *et al.* (2016) en arroz (*Oryza sativa* L.), el que

se observó un rápido crecimiento de las raíces ocasionando una disminución significativa en el contenido de N, este efecto fue relacionado a los NTCPM disminuyendo significativamente la asimilación de N. Tiwari *et al.* (2014) reportaron la disminución del contenido de K y un aumento en el contenido de Ca durante la germinación *in vitro* de maíz (*Zea mays*) a partir de 5 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM. El Ca disminuyó a partir de 20 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM; mientras que, el contenido de P, Mg y Na aumentó a partir de 20 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM y disminuyó a partir de 50 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM. El contenido de Fe aumentó a partir de 50 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM y disminuyó a partir de 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM; el S no se observaron cambios. Estos autores sugieren que el aumento y disminución de elementos puede ser debido a un mecanismo de intercambio de iones en la pared celular ocasionado por NTCPM.

Taha *et al.* (2016) en brotes de Palmera datilera (*Phoenix dactylifera*) crecidas *in vitro*, encontraron que el contenido de N y P incrementó en la concentración de 0.1 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM, mientras que K y Ca tuvieron un aumento en la concentración de 0.05 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM; por otra parte, el contenido de Na<sup>+</sup> disminuyó al aumentar la concentración de nanotubos de carbono; esto podría demostrar la capacidad de los nanotubos de transportar iones de Na del interior al exterior de las células.

Los NTC tienen capacidad de transportar metales pesados (Cu, Cd, Zn, Pb) sin gasto de energía; sin embargo, la absorción de estos metales depende de la concentración de NTC, el metal pesado y el genotipo de plantas (Oloumi *et al.*, 2018, Sun *et al.*, 2020), simulando un efecto quelante. Martínez- Ballesta *et al.* (2020) en protoplastos de brócoli (*Brassica oleracea* L.), observaron que en una concentración de 10 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM el contenido de P y Fe aumentó.

#### **6.4 Discusión general**

En este estudio se demostró el uso potencial de los nanotubos de carbono durante la propagación *in vitro* de caña de azúcar, los cuales juegan un papel importante en el desarrollo de vegetal. Lahiani *et al.* (2013) menciona que los nanotubos de carbono tienen la capacidad de penetrar las células vegetales y a altas concentraciones pueden actuar como un factor de estrés, afectando la sobreexpresión de las acuaporinas. Las acuaporinas son canales transmembranales encargados del transporte de agua y pequeños solutos como urea, amoníaco, metaloides, gases e incluso iones. Las acuaporinas se regulan en respuesta a múltiples



estímulos ambientales y hormonales; las cuales contribuyen en varios procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas (Li *et al.*, 2014; Verdoucq y Maurel 2018). Por otro lado, de acuerdo con Zhao *et al.* (2017), la internalización de los NTCPM en las células podría ser a través de los poros de la pared celular, ocasionando su expansión con diferentes efectos en el desarrollo de las plantas de acuerdo a su concentración. Zhai *et al.* (2015) en soya (*Glycine max*) demostraron la presencia de NTCPM en el citoplasma, pared celular, membrana celular, cloroplasto y mitocondrias. De acuerdo a Selvaraj y Gobikrishnan, (2020) en genotipos de caña de azúcar silvestre (*Saccharum spontaneum*), el diámetro del poro en células oscila entre 3.65 y 9.71 nm. Los NTCPM utilizados en este estudio tienen un diámetro entre 6 y 13 nm. Esto podría relacionarse con la penetración de los NTCPM dentro de las células de *Saccharum* spp. en donde se podrían expandir a través de la membrana celular ocasionando los efectos descritos en este estudio. Además, los resultados obtenidos sugieren un efecto hormético, caracterizado por una estimulación en dosis bajas y una inhibición en concentraciones altas; sin embargo, se requiere evaluar concentraciones superiores a 200 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM. El efecto hormético en plantas está relacionado por la activación de enzimas antioxidantes en respuesta a una baja producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) ocasionado por un estímulo estresante. González-García *et al.* (2019) en tomate (*Solanum lycopersicum*) demostraron un aumento de la capacidad antioxidante en concentraciones de 10 a 100 mg L de NTCPM y toxicidad dentro de un rango de 250 a 1000 mg L<sup>-1</sup> de NTCPM.

Por otro lado, otros autores mencionan que los NTCPM podrían actuar como reguladores del crecimiento, ya que a bajas concentraciones impactan en el desarrollo de las plantas (Khodakovskaya *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2014). Mathew *et al.* (2020) estudiaron, el efecto de los NTC podría estar relacionado especie de planta, etapa de desarrollo, condiciones de crecimiento, el tipo de nanotubos, tamaño y concentración.

En este estudio se demostró que los NTCPM tienen efecto sobre el crecimiento y diferenciación de brotes, contenido de pigmentos fotosintéticos y contenido de macro y micronutrientes. Además, los NTCPM tienen un efecto sobre la absorción de nutrientes, dando como resultado el incremento de la tasa de multiplicación de los brotes de caña de azúcar. Estos resultados abren la posibilidad de aplicar NTCPM para la multiplicación *in vitro* en otros cultivos de interés agrícola.

## 7. CONCLUSIONES

De acuerdo a la caracterización morfológica y morfométrica los nanotubos de carbono de pared se confirmaron las dimensiones proporcionadas por la marca del producto (CAS: 308068-56-6) con un diámetro de 6-13 nm y longitud de 2.5-20  $\mu\text{m}$ .

Los nanotubos de carbono tuvieron un efecto sobre el desarrollo *in vitro* de explantes de caña de azúcar. Las concentraciones de 100 y 200  $\text{mg L}^{-1}$  de NTCPM promovieron el mayor número de brotes por explante, número hojas por brote y porcentaje de materia seca. Sin embargo, en la concentración de, 200  $\text{mg L}^{-1}$  de NTCPM se observó un incremento de la longitud de los brotes.

El contenido de clorofila aumentó en las concentraciones de 50 y 100  $\text{mg L}^{-1}$  de NTCPM y disminuyó en concentraciones de 0 y 200  $\text{mg L}^{-1}$  de NTCPM.

Se observó un aumento en el contenido de carbono relacionado al incremento de las concentraciones de nanotubos de carbono adicionados al medio de cultivo.

Los nanotubos de carbono tuvieron efecto sobre el contenido N, Ca, S, Fe, Cu, Zn y Na. En concentraciones de 100 y 200  $\text{mg L}^{-1}$  de NTCPM el contenido de N y Na disminuyó; mientras que, el contenido de Ca y S aumentó. El contenido de Cu disminuyó en los tratamientos con nanotubos de carbono. El contenido de Fe y Zn aumentó en concentraciones de 50 y 100  $\text{mg L}^{-1}$  de NTCPM.

Se demostró que la administración de NTCPM a una concentración 100  $\text{mg L}^{-1}$  produce efectos fisiológicos favorables sobre el desarrollo en etapa de multiplicación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. Mex 69-290) utilizando biorreactores de inmersión temporal. Mientras que concentraciones superiores a 200  $\text{mg L}^{-1}$  los NTCPM produce efectos negativos en el desarrollo de los explantes. Estos resultados indicaron que bajas dosis pueden inducir hormesis durante la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar y puede tener un uso potencial en otras especies.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Agathokleous, E., Feng, Z., Iavicoli, I., and Calabrese, E. J. (2019). The two faces of nanomaterials: a quantification of hormesis in algae and plants. *Environment international*, *131*, 105044.
- Ahmad, M. and Silva, S. R. P. (2020). Low temperature growth of carbon nanotubes—A review. *Carbon*, *158*, 24-44.
- Ali, M. A., Rehman, I., Iqbal, A., Din, S., Rao, A. Q., Latif, A. and Husnain, T. (2014). Nanotechnology, a new frontier in Agriculture. *Advancements in Life Sciences*, *1*(3), 129-138.
- Alvard, D., Cote, F. and Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant cell, tissue and organ culture*, *32*(1), 55-60.
- Arencibia, A. D., Bernal, A., Yang, L., Cortegaza, L., Carmona, E. R., Perez, A. and Santana, I. (2008). New role of phenylpropanoid compounds during sugarcane micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Plant Science*, *175*(4), 487-496.
- Balandrán-Quintana, R. R., Romero-Villegas, G. I., Mendoza-Wilson, A. M. and Sotelo-Mundo, R. R. (2008). Nanotubos de carbono y bionanotecnología. *Interciencia*, *33*(5), 331-336.
- Barnabas, L., Ramadass, A., Amalraj, R. S., Palaniyandi, M., and Rasappa, V. (2015). Sugarcane proteomics: An update on current status, challenges, and future prospects. *Proteomics*, *15*(10), 1658-1670.
- Bednarek, P. T. and Orłowska, R. (2020). Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi) genetic changes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* , *140*(2), 245-257.
- Bello-Bello, J. J., Chavez-Santoscoy, R. A., Lecona-Guzman, C. A., Bogdanchikova, N., Salinas-Ruíz, J., Gómez-Merino, F. C. and Pestryakov, A. (2017). Hormetic response by silver nanoparticles on in vitro multiplication of sugarcane (*Saccharum* spp. Cv. Mex 69-290) using a temporary immersion system. *Dose-Response*, *15*(4), 1559325817744945.
- Bello-Bello, J. J., Cruz-Cruz, C. A., and Pérez-Guerra, J. C. (2019). A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *55*(3), 313-320.

Bello-Bello, J. J., Mendoza-Mexicano, M., and Pérez-Sato, J. A. (2018). In Vitro Propagation of Sugarcane for Certified Seed Production. In *Sugarcane-Technology and Research*. IntechOpen.

Bello-Bello, J. J., Morales-Ramos, V., y Gómez-Merino, F. C. (2014). Conservación de recursos genéticos de Caña de azúcar (*Saccharum spp.*). *AGROProductividad*, 7(2), 42-47.

Bernal, A., Machado, P., Cortegaza, L., Carmona, E. R., Rivero, O., Zayas, C. M. and Arencibia, A. D. (2008). Priming and biopriming integrated into the sugarcane micropropagation technology by Temporary Immersion Bioreactors (TIBS). *Sugar Tech*, 10(1), 42-47.

Bhushan, B. (2017). Introduction to nanotechnology. In *Springer handbook of nanotechnology* (pp. 1-19). Springer, Berlin, Heidelberg.

Bigott, A. F., Hoy, J. W., and Fultz, L. M. (2019). Soil properties, microbial communities, and sugarcane yield in paired fields with short-or long-term sugarcane cultivation histories. *Applied Soil Ecology*, 142, 166-176.

Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA*, 8.

Castro-González, C. G., Sánchez-Segura, L., Gómez-Merino, F. C. and Bello-Bello, J. J. (2019). Exposure of stevia (*Stevia rebaudiana* B.) to silver nanoparticles in vitro: transport and accumulation. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.

Chirumamilla, P., Gopu, C., Jogam, P., and Taduri, S. (2020). Highly efficient rapid micropropagation and assessment of genetic fidelity of regenerants by ISSR and SCoT markers of *Solanum khasianum* Clarke. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1-11.

CONADESUCA (2020). *Concluye la zafra 2019/2020*. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. <https://www.gob.mx/conadesuca/prensa/concluye-la-zafra-2019-2020?idiom=es>

Criollo-Chan, M. A., Osnaya-Gonzalez, M. L., Robledo-Paz, A., Monsalvo-Espinosa, J. A., Echeverría-Echeverría, S. T., Alamilla-Magaña, J. C., y Caamal-Velázquez, J. H. (2016). Reducción de costos en la micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum spp.*). *AGROProductividad*, 9(7).

- Da Silva, J. A., Solis-Gracia, N., Jifon, J., Souza, S. C. and Mandadi, K. K. (2020). Use of bioreactors for large-scale multiplication of sugarcane (*Saccharum spp.*), energy cane (*Saccharum spp.*), and related species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1-11.
- Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G., and Saito, R. (1995). Physics of carbon nanotubes. *Carbon*, 33(7), 883-891.
- Efferth, T. (2019). Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*, 5(1), 50-59.
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., and Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18(9), 743-748.
- Escalona, M., Samson, G., Borroto, C., and Desjardins, Y. (2003). Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39(6), 651-656.
- Etienne, H., and Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215-231.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A. y Bley, T. (2014). Sistemas de inmersión temporal en biotecnología vegetal. *Ingeniería en ciencias de la vida*, 14 (6), 607-621.
- Etienne, H., Bertrand, B., Georget, F., Lartaud, M., Montes, F., Dechamp, E. and Barry-Etienne, D. (2013). Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree Physiology*, 33(6), 640-653.
- FIRA (2010). Producción Sostenible de Caña de Azúcar en México en Boletín Informativo, Nueva Época, Núm. 11, Año 2010.
- George, E. F., Hall, M. A. and De Klerk, G. J. (2008). Micropropagation: uses and methods. In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 29-64). Springer, Dordrecht.
- Getnet, B. (2017). Review on in vitro propagation of sugarcane to advance the value of tissue culture. *Agri Res Tech: Open Access J*, 5(4), 555670.

Ghasempour, M., Iranbakhsh, A., Ebadi, M., & Ardebili, Z. O. (2019). Multi-walled carbon nanotubes improved growth, anatomy, physiology, secondary metabolism, and callus performance in *Catharanthus roseus*: an in vitro study. *3 Biotech*, 9(11), 1-10.

Ghorbanpour, Mansour; Hadian, Javad (2015). Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown in vitro. *Carbon*, 94(), 749-759.

González-García, Y., López-Vargas, E. R., Cadenas-Pliego, G., Benavides-Mendoza, A., González-Morales, S., Robledo-Olivo, A., and Juárez-Maldonado, A. (2019). Impact of carbon nanomaterials on the antioxidant system of tomato seedlings. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 5858.

Hao, Y., Yu, F., Lv, R., Ma, C., Zhang, Z., Rui, Y., and Xing, B. (2016). Carbon nanotubes filled with different ferromagnetic alloys affect the growth and development of rice seedlings by changing the C: N ratio and plant hormones concentrations. *PLoS One*, 11(6), e0157264.

Hasner, C., de Lima, A. A. and Winter, E. (2019). Technology advances in sugarcane propagation: A patent citation study. *World Patent Information*, 56, 9-16.

Jalal, A., de Oliveira Junior, J. C., Ribeiro, J. S., Fernandes, G. C., Mariano, G. G., Trindade, V. D. R., and Dos Reis, A. R. (2021). Hormesis in plants: physiological and biochemical responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111225.

Kaur, A. and Sandhu, J. S. (2015). High throughput in vitro micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: cost analysis for agri-business industry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120(1), 339-350.

Khodakovskaya, M. V., De Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E., and Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS nano*, 6(3), 2128-2135.

Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F., and Biris, A. S. (2009). Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS nano*, 3(10), 3221-3227.

- Lahiani, M. H., Dervishi, E., Chen, J., Nima, Z., Gaume, A., Biris, A. S., and Khodakovskaya, M. V. (2013). Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops. *ACS applied materials & interfaces*, 5(16), 7965-7973.
- Li, G., Santoni, V., and Maurel, C. (2014). Plant aquaporins: roles in plant physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(5), 1574-1582.
- Lira Saldivar, R. H., Méndez Argüello, B., Santos Villarreal, G. D. L. and Vera Reyes, I. (2018). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta universitaria*, 28(2), 9-24.
- Llobet, E. (2013). Gas sensors using carbon nanomaterials: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 179, 32-45.
- López-Vargas, E. R., González-García, Y., Pérez-Álvarez, M., Cadenas-Pliego, G., González-Morales, S., Benavides-Mendoza, A., and Juárez-Maldonado, A. (2020). Seed Priming with Carbon Nanomaterials to Modify the Germination, Growth, and Antioxidant Status of Tomato Seedlings. *Agronomy*, 10(5), 639.
- Loyola-Vargas, V. M. and Ochoa-Alejo, N. (2018). An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. In *Plant cell culture protocols* (pp. 3-13). Humana Press, New York, NY.
- Lu, S. and Merkle, S. A. (2020). Enhancing hybrid Liquidambar somatic seedling production using a temporary immersion bioreactor. *Trees*, 1-10.
- Majeed, N., Panigrahi, K. C., Sukla, L. B., John, R. and Panigrahy, M. (2020). Application of carbon nanomaterials in plant biotechnology. *Materials Today: Proceedings*.
- Mali, S. C., Raj, S., and Trivedi, R. (2020). Nanotechnology a novel approach to enhance crop productivity. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 24, 100821.
- Martinez-Ballesta, M. C., Chelbi, N., Lopez-Zaplana, A., and Carvajal, M. (2020). Discerning the mechanism of the multiwalled carbon nanotubes effect on root cell water and nutrient transport. *Plant Physiology and Biochemistry*, 146, 23-30.

- Martínez-Ballesta, M. C., Zapata, L., Chalbi, N and Carvajal, M. (2016). Multiwalled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. *Journal of nanobiotechnology*, 14(1), 1-14.
- Martínez-Estrada, E., Caamal-Velázquez, J. H., Salinas-Ruíz, J. and Bello-Bello, J. J. (2017). Assessment of somaclonal variation during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53(6), 553-560.
- Martínez-Estrada, E., Islas-Luna, B., Pérez-Sato, J. A. and Bello-Bello, J. J. (2019). Temporary immersion improves in vitro multiplication and acclimatization of *Anthurium andreaeanum* Lind. *Scientia Horticulturae*, 249, 185-191.
- Mathew, S., Tiwari, D. K., and Tripathi, D. (2020). Interaction of carbon nanotubes with plant system: A review. *Carbon Letters*, 1-10.
- Maynard, A. D. (2006). Nanotechnology: assessing the risks. *Nano today*, 1(2), 22-33.
- McNeil, SE (2005). Nanotecnología para el biólogo. *Revista de biología de leucocitos*, 78 (3), 585-594.
- Miralles, P., Johnson, E., Church, T. L., and Harris, A. T. (2012). Multiwalled carbon nanotubes in alfalfa and wheat: toxicology and uptake. *Journal of the Royal Society Interface*, 9(77), 3514-3527.
- Mittal, J., Osheen, S., Gupta, A. and Kumar, R. (2019). Carbon Nanomaterials in Agriculture. In *Nanoscience for Sustainable Agriculture* (pp. 153-170). Springer, Cham.
- Monja-Mio, K. M., Herrera-Alamillo, M. Á. and Robert, M. L. (2016). Somatic embryogenesis in temporary immersion bioreactors. In *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* (pp. 435-454). Springer, Cham.
- Mukherjee, A., Majumdar, S., Servin, A. D., Pagano, L., Dhankher, O. P. and White, J. C. (2016). Carbon nanomaterials in agriculture: a critical review. *Frontiers in plant science*, 7, 172.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15(3):473–497.



- Oloumi, H., Mousavi, E. A., and Nejad, R. M. (2018). Multi-wall carbon nanotubes effects on plant seedlings growth and cadmium/lead uptake in vitro. *Russian journal of plant physiology*, 65(2), 260-268.
- Pandey, K., Lahiani, M.H., Hicks, V.K., Keith Hudson, M., Green and M.J., Khodakovskaya, M., (2018). Effects of carbon-based nanomaterials on seed germination, biomass accumulation and salt stress response of bioenergy crops. *PLoS One* 13, e0202274.
- Paramo, L. A., Feregrino-Pérez, A. A., Guevara, R., Mendoza, S., and Esquivel, K. (2020). Nanoparticles in agroindustry: Applications, toxicity, challenges, and trends. *Nanomaterials*, 10(9), 1654.
- Paret, M. L., Vallad, G. E., Averett, D. R., Jones, J. B. and Olson, S. M. (2013). Photocatalysis: effect of light-activated nanoscale formulations of TiO<sub>2</sub> on *Xanthomonas perforans* and control of bacterial spot of tomato. *Phytopathology*, 103(3), 228-236.
- Pérez Molphe Balch Eugenio Martín, Ramírez Malagón Rafael, Gordon Núñez Malagón Héctor and Ochoa Alejo Neftalí, (1999). Introducción Al Cultivo De Tejidos Vegetales. Aguascalientes: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Polischchuk, S. D., Nazarova, A. A., Churilov, D. G., Churilova, V. V., Churilov, G. I., Stepanova, I. A., and Arapov, I. S. (2020, May). Effect of “low doses” of multiwall carbon nanotubes when interacting with white mustard seeds and sprouts. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 488, No. 1, p. 012034). IOP Publishing.
- Popov, V. N. (2004). Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 43(3), 61-102.
- Prasad, R., Bhattacharyya, A., and Nguyen, Q. D. (2017). Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives. *Frontiers in microbiology*, 8, 1014.
- Rahmani, N., Radjabian, T., and Soltani, B. M. (2020). Impacts of foliar exposure to multi-walled carbon nanotubes on physiological and molecular traits of *Salvia verticillata* L., as a medicinal plant. *Plant Physiology and Biochemistry*, 150, 27-38.

- Ramírez-Cathí, H., Martínez, A. C. S., Encina, F. B., Magaña, F. L., Lara, A. C., Álvarez, C. M. and González, J. M. (2014). Rendimiento, caracterización morfológica y bromatológica de la punta de caña de azúcar en la Huasteca Potosina, México. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(4), 411-415.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Sánchez-Segura, L., Hernández-Valladolid, S. L., Bello-Bello, E. and Bello-Bello, J. J. (2020). Influence of silver nanoparticles on a common contaminant isolated during the establishment of *Stevia rebaudiana* Bertoni culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-10.
- Redae, M. H. and Ambaye, T. G. (2018). In Vitro propagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) variety C86-165 through apical meristem. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 14, 228-234.
- Ren, L., Deng, S., Chu, Y., Zhang, Y., Zhao, H., Chen, H. and Zhang, D. (2020). Single-wall carbon nanotubes improve cell survival rate and reduce oxidative injury in cryopreservation of *Agapanthus praecox* embryogenic callus. *Plant methods*, 16(1), 1-12.
- Rivera, N. A., Mendoza, G. G., Martínez, J. F. y Servin, C. C. (2010). Competitividad internacional de la industria azucarera de México. *Theoria*, 19(1), 7-29.
- Rivero, A. M., Frómeta, O. M., Daquinta, M., and Morgado, M. M. E. (2018). Efecto del Vitrofur® en la calidad morfofisiológica de brotes de caña de azúcar var. C 1051-73 propagados en Biorreactores de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal*, 18(2).
- Rivero, A. M., Ramírez-Mosqueda, M. A., Frómeta, O. M., Morgado, M. M. E., Paneca, M. R., Escriba, R. C. R. and Bello-Bello, J. J. (2020). Influence of Vitrofur® on sugarcane micropropagation using temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-7.
- Rivero, A. V., and Tyron, F. M. (2020). La quema de cañaverales y su influencia en la composición de arvenses, en zonas de la costa ecuatoriana. *Universidad Ciencia y Tecnología*, 1(1), 74-80.
- SADER (2019): Etapas del cultivo de caña. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/etapas-del-cultivo-de-cana>

SADER (2020). Caña de azúcar, una dulce producción. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/cana-de-azucar-una-dulce-produccion-237168?idiom=es>

Saleem, H., and Zaidi, S. J. (2020). Recent developments in the application of nanomaterials in agroecosystems. *Nanomaterials*, 10(12), 2411.

Samadi, S., Lajayer, B. A., Moghiseh, E., and Rodríguez-Couto, S. (2021). Effect of carbon nanomaterials on cell toxicity, biomass production, nutritional and active compound accumulation in plants. *Environmental Technology & Innovation*.

Samadi, S., Saharkhiz, M. J., Azizi, M., Samiei, L., and Ghorbanpour, M. (2020). Multi-walled carbon nanotubes stimulate growth, redox reactions and biosynthesis of antioxidant metabolites in *Thymus daenensis* celak. in vitro. *Chemosphere*, 249, 126069.

San José, M. C., Blázquez, N., Cernadas, M. J., Janeiro, L. V., Cuenca, B., Sánchez, C. and Vidal, N. (2020). Temporary immersion systems to improve alder micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 143(2), 265-275.

Seddighinia, F. S., Iranbakhsh, A., Ardebili, Z. O., Satari, T. N., and Soleimanpour, S. (2020). Seed priming with cold plasma and multi-walled carbon nanotubes modified growth, tissue differentiation, anatomy, and yield in bitter melon (*Momordica charantia*). *Journal of plant growth regulation*, 39(1), 87-98.

Segretín, M. E. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología*, 2, 5-8.

Selvaraj, A., and Gobikrishnan, S. (2020). Physicochemical Characterization of Native and Steam Explosion Pretreated Wild Sugarcane (*Saccharum spontaneum*). *International Journal of Renewable Energy Development*, 9(3).

Shang, Y., Hasan, M. K., Ahammed, G. J., Li, M., Yin, H., and Zhou, J. (2019). Applications of Nanotechnology in Plant Growth and Crop Protection: A Review. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(14), 2558.

Shoukat, R., and Khan, M. I. (2021). Carbon nanotubes: A review on properties, synthesis methods and applications in micro and nanotechnology. *Microsystem Technologies*, 1-10.

- Snyman, S. J., Shezi, S. N. and Ramburan, S. (2018). Field Assessment of In Vitro Micropropagated NovaCane® Sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). *Sugar Tech*, 20(5), 609-612.
- Spinoso-Castillo, J. L., Chavez-Santoscoy, R. A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J. A., Morales-Ramos, V. and Bello-Bello, J. J. (2017). Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* , 129(2), 195-207.
- Strasburger E., Noll F., Schenck H. y Schimper A. F. W. 1988. Tratado de Botánica, 6ª ed. española. Traducción de la 32ª ed. Alemana por Oriol de Bolós. Barcelona. Mirin. 1038 p
- Sun, C., Li, W., Xu, Y., Hu, N., Ma, J., Cao, W., and Huang, Q. (2020). Effects of carbon nanotubes on the toxicities of copper, cadmium and zinc toward the freshwater microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Aquatic Toxicology*, 224, 105504.
- Taha, R. A., Hassan, M. M., Ibrahim, E. A., Abou Baker, N. H., and Shaaban, E. A. (2016). Carbon nanotubes impact on date palm in vitro cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127(2), 525-534.
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology*, 37(2), 169-180.
- Timoteo, C.d., Paiva, R., dos Reis, M. V., Claro, P. I. C., da Silva, D. P. C., Marconcini, J. M., and de Oliveira, J. E. (2019). Silver nanoparticles in the micropropagation of *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137(2), 359-368.
- Tiwari, D. K., Dasgupta-Schubert, N., Cendejas, L. V., Villegas, J., Montoya, L. C., and García, S. B. (2014). Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. *Applied Nanoscience*, 4(5), 577-591.
- Usman, M., Farooq, M., Wakeel, A., Nawaz, A., Cheema, S. A., ur Rehman, H., ... & Sanaullah, M. (2020). Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. *Science of the Total Environment*, 721, 137778.
- Verdoucq, L., and Maurel, C. (2018). Plant aquaporins. *Advances in Botanical Research*, 87, 25-56.

Verma, S. K., Das, A. K., Gantait, S., Kumar, V., and Gurel, E. (2019). Applications of carbon nanomaterials in the plant system: a perspective view on the pros and cons. *Science of the Total Environment*, 667, 485-499.

Vervit (2020). SETIS™ Biorreactor Sistemas de inmersión temporal en micropropagación de plantas. <http://www.setis-systems.be>. Citado 01 de diciembre 2020

Wang, X., Han, H., Liu, X., Gu, X., Chen, K. and Lu, D. (2012). Multi-walled carbon nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticum aestivum*) plants. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(6), 841. doi.org/10.1007/s11051-012-0841-5

Watt, M. P. (2012). The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*, 11(76), 14025-14035.

Yang, L., Zambrano, Y., Hu, C. J., Carmona, E. R., Bernal, A., Pérez, A. and Arencibia, A. D. (2010). Sugarcane metabolites produced in CO<sub>2</sub>-rich temporary immersion bioreactors (TIBs) induce tomato (*Solanum lycopersicum*) resistance against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(6), 558-568.

Yousefi, S., Kartoolinejad, D., and Naghdi, R. (2017). Effects of priming with multi-walled carbon nanotubes on seed physiological characteristics of Hopbush (*Dodonaea viscosa* L.) under drought stress. *International Journal of Environmental Studies*, 74(4), 528-539.

Zan, F., Zhang, Y., Wu, Z., Zhao, J., Wu, C., Zhao, Y., and Yang, X. (2020). Genetic analysis of agronomic traits in elite sugarcane (*Saccharum* spp.) germplasm. *Plos one*, 15(6), e0233752.

Zaytseva, O., and Neumann, G. (2016). Carbon nanomaterials: production, impact on plant development, agricultural and environmental applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 17.

Zhai, G., Gutowski, S. M., Walters, K. S., Yan, B., and Schnoor, J. L. (2015). Charge, size, and cellular selectivity for multiwall carbon nanotubes by maize and soybean. *Environmental science & technology*, 49(12), 7380-7390.

Zhao, Q., Ma, C., White, J. C., Dhankher, O. P., Zhang, X., Zhang, S., and Xing, B. (2017). Quantitative evaluation of multi-wall carbon nanotube uptake by terrestrial plants. *Carbon, 114*, 661-670.

## **9. ANEXOS**