

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

POSTGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

**EXPOSICIÓN *in vitro* DE ESTEVIA (*Stevia rebaudiana* B.)
A NANOPARTÍCULAS DE PLATA: TRANSPORTE Y ACUMULACIÓN**

CELIA GUADALUPE CASTRO GONZÁLEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

2018

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

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el (la) que suscribe **Celia Guadalupe Castro González**, Alumno(a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del profesor(a) **Dr. Jericó Jabín Bello Bello**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **“EXPOSICIÓN *in vitro* DE ESTEVIA (*Stevia rebaudiana* B.) A NANOPARTÍCULAS DE PLATA: TRANSPORTE Y ACUMULACIÓN”** Y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Profesor Consejero(a) o Director(a) de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Amatlán de los Reyes, Veracruz a **20 de septiembre de 2018**



Firma



Vo.Bo.del Profesor Consejero o Director de Tesis

La presente tesis, titulada: **EXPOSICIÓN *in vitro* DE ESTEVIA (*Stevia rebaudiana* B.) A NANOPARTÍCULAS DE PLATA: TRANSPORTE Y ACUMULACIÓN** realizada por la alumna: **Celia Guadalupe Castro González**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA(O) EN CIENCIAS
INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


DR. JERICÓ JABÍN BELLO BELLO

ASESOR INTERNO:


DR. VICTORINO MORALES RAMOS

ASESOR EXTERNO:


DR. LINO SANCHÉZ SEGURA

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, 2018

EXPOSICIÓN *in vitro* DE ESTEVIA (*Stevia rebaudiana* B.) A NANOPARTÍCULAS DE PLATA: TRANSPORTE Y ACUMULACIÓN

Celia Guadalupe Castro González, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2018.

RESÚMEN

El impacto de la nanotecnología en el campo de las ciencias agrícolas abre la necesidad de estudiar con mayor detalle el efecto de productos que ofrecen nanopartículas para su aplicación en especies vegetales de interés agrícola. El objetivo de este estudio fue caracterizar las propiedades fisicoquímicas de nanopartículas de plata (NPsAg), así como el efecto de la concentración en la respuesta fisiológica de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) cultivada *in vitro*. Se utilizaron segmentos nodales (con dos brotes) de estevia crecidas en medio Murashige and Skoog (MS) adicionadas con NPsAg (0, 12.5, 25, 50, 100 y 200 mg/L). Después de 30 días de la proliferación *in vitro* de brotes, se evaluó el número de brotes por explante, longitud de los brotes, el contenido de clorofilas, la materia seca y finalmente se cuantificó el contenido de plata metálica (Ag) presente en las plantas. Además, la caracterización, el transporte y la acumulación de nanopartículas de plata se lograron mediante análisis microscópico. Las características de las NPsAg fueron de morfología circular, con diámetro de 35 ± 15 nm y presentaron mayor fluorescencia a 427 nm. La aplicación de 12.5, 25 y 50 mg/L de NPsAg promovió la mayor producción y longitud de brotes por explante. La materia seca mostró un incremento en los tratamientos de 100 y 200 mg/L. Además, se observó un incremento en el contenido de clorofilas a partir de 50 mg/L. Se demostró presencia de NPsAg en células epidérmicas de tallo, dentro de haces vasculares y en espacios intermembranales. En hoja, se observaron en nervaduras y en estomas, concluyendo que el mecanismo de transporte para nanopartículas (NPs) de mayor tamaño es vía apoplasto, y simplasto para NPs de menor tamaño. Estos resultados abren la posibilidad de aplicar NPsAg para evaluar el potencial de su uso en cultivos *in vitro* de interés agrícola.

Palabras clave: bionanotecnología, estevia, fluorescencia, microscopio multifotón.

***In vitro* EXPOSURE OF STEVIA (*Stevia rebaudiana* B.) TO SILVER
NANOPARTICLES: TRANSPORT AND ACCUMULATION**

Celia Guadalupe Castro González, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2018.

ABSTRACT

The impact of nanotechnology in the field of agricultural sciences creates the need to study in greater detail the effect of products offering nanoparticles for application in plant species of agricultural interest. The objective of this study was to characterize the physicochemical properties of silver nanoparticles (AgNPs), as well as the effect of their concentration on the physiological response of stevia (*Stevia rebaudiana* B.) cultured *in vitro*. Nodal segments (with two buds) of stevia grown in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with AgNPs (0, 12.5, 25, 50, 100 and 200 mg/L) were used. After 30 days of *in vitro* shoot proliferation, the number of shoots per explant, shoot length, chlorophyll content, dry matter content and finally the metallic silver (Ag) content of the plants were quantified. In addition, characterization, transport and accumulation of silver nanoparticles were achieved by microscopic analysis. The AgNPs were round in shape, with a diameter of 35 ± 15 nm, and they showed greater fluorescence at 427 nm. Applying 12.5, 25 and 50 mg/L of AgNPs promoted the greatest shoot production and length per explant. Dry matter showed an increase in the 100 and 200 mg/L treatments. In addition, an increase in chlorophyll content was observed from 50 mg/L. AgNPs were shown to be present in epidermal stem cells, within vascular bundles and in intermembrane spaces. In leaves, they were observed in ribs and stomata, concluding that the transport mechanism for larger nanoparticles (NPs) is via the apoplast, and for smaller NPs via the symplast. These results open up the possibility of applying AgNPs to evaluate their potential use in *in vitro* crops of agricultural interest.

Key words: bionanotechnology, stevia, fluorescence, multiphoton microscope.

AGRADECIMIENTOS

Con dedicación a:

A mis padres y hermana: Celio Castro Fernández, María Agripina González Sánchez y Selma Castro González, por su apoyo incondicional, su paciencia y comprensión a lo largo de mis veinticuatro años. Además, por aceptar y entender el camino que he decidido tomar dentro del ámbito profesional.

A Sebastián, Anisah y Mayda: Por ser tres grandes motivos para seguir día a día esforzándome por cumplir todos mis objetivos en la vida. Siempre serán mis niños favoritos.

A Ricardo Ríos: Por permanecer conmigo en las buenas y las malas con amor, comprensión, alegría y por escucharme en cada momento que lo he necesitado.

A mis hermanos de la vida: Gael García y Jaime Corona, con quienes cierro un ciclo muy importante en nuestras vidas. Gracias por ayudarme, motivarme, escucharme y siempre estar cuando lo necesité.

A mis amigos del colegio de postgraduados: Eduardo, Isabel, Eucario, Michí, Dra. Miriam, Alma, Ángel, Aráis y al Dr. Marco por ayudarme a resolver dudas, por regalarme momentos divertidos a lo largo de mi maestría y por compartir experiencias, con mucho cariño.

Agradeciendo sinceramente:

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

A la Red Internacional de Bionanotecnología del CNyN-UNAM.

Al Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. A la Dra. Maritza Marcela Escalona por recibirme con entusiasmo en su laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. A Osbel, Iris, Iván, Grey, Melisa, Noel, Yariane, Chino, Cococori, Yordany, Delia y Héctor por nunca dejarme sola y hacerme sentir como en casa durante mi estancia en Ciego de Ávila, Cuba.

Al CINESTAV Unidad Irapuato. Al departamento de microscopía y en especial al Dr. Lino Sánchez Segura, por enseñarme de manera entusiasta sus conocimientos en el área.

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

A mi consejero, el Dr. Jericó Jabín Bello Bello, por ayudarme a crecer durante estos años de trabajo juntos, por la confianza y paciencia que me ha tenido.

A mis profesores, compañeros, amigos de toda la vida y en general a cada persona que de alguna manera fue parte de los dos años más hermosos de mi vida durante mi maestría, GRACIAS.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos particulares	3
3. HIPOTESIS	4
4. MARCO TEÓRICO	5
4.1 Estevia (<i>Stevia rebaudiana</i> B.)	5
4.2 Cultivo de Tejidos Vegetales	6
4.3 Micropropagación en Sistemas de Inmersión Temporal	7
4.4 Nanotecnología y Nanopartículas	8
4.4.1 Características de las partículas.....	8
4.4.2 Análisis Digital de Imágenes	9
4.5 Nanopartículas de Plata.....	10
4.5.1 Propiedades y aplicaciones de las NPsAg en el CTV	11
4.7 Transporte de nanomateriales en vegetales	14
4.8 Uso de microscopía para localización de NPsAg en vegetales	16
4.9 Cuantificación de Plata (Ag) en un sistema vegetal.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 Ubicación del área de trabajo	19
5.2 Estrategia experimental	19
5.3 Caracterización de nanopartículas de plata	20
5.4 Material vegetal y establecimiento <i>in vitro</i>	21

5.5	Efecto de NPsAg durante la multiplicación de brotes	22
5.6	Contenido de clorofila	22
5.7	Mediciones del contenido de Plata total.....	23
5.8	Evaluación de la deposición de NPs en tejidos.....	23
5.9	Análisis estadístico.....	24
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
6.1	Características fisicoquímicas de Argovit.....	26
6.2	Efecto de NPsAg en la multiplicación <i>in vitro</i>	28
6.3	Efecto de nanopartículas de Plata en el contenido de clorofila	32
6.4	Acumulación de NPsAg en tallos	34
7.	CONCLUSIONES	40
8.	LITERATURA CITADA	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT®).	8
Figura 2. Nanopartículas de plata observadas mediante MET.....	9
Figura 3. Captación y transporte de Nanopartículas.	15
Figura 4. Localización de plata en raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
Figura 5. Efecto en el lavado, análisis mediante SEM de la superficie de las hojas de lechuga.....	17
Figura 6. Estrategia experimental.....	20
Figura 7. MET imagen de NPsAg usando diferentes magnificaciones.	27
Figura 8. Efecto de NPsAg en la regeneración <i>in vitro</i> de estevia.....	29
Figura 9. Brotes de estevia (<i>Stevia rebaudiana</i> B.)	30
Figura 10. Contenido de clorofila después de la exposición de estevia (<i>Stevia rebaudiana</i> B.) a diferentes concentraciones de Argovit.	33
Figura 11. Identificación de fluorescencia en puntos específicos en epidermis de tallos de estevia (campo claro y campo de fluorescencia).....	35
Figura 12. Identificación de fluorescencia por microscopio multifotón en puntos específicos en tallos y hojas de estevia.	37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estudios que demuestran efectos favorables del uso de NPsAg en plantas <i>in vitro</i>	13
Tabla 2. Características fisicoquímicas de Argovit.....	26

1. INTRODUCCIÓN

La utilización de las nanopartículas de plata (NPsAg) en sistemas biológicos son parte del desarrollo de la Bionanotecnología. Esta disciplina ofrece alternativas para solución de problemas relacionados a la producción de cultivos agroalimentarios mediante la inhibición de agentes microbianos (Mousavi y Rezaei, 2011; Pokhrel *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2018). En plantas, las NPsAg han sido utilizadas para inducir la germinación, aumentar rendimientos en cultivos y promover el desarrollo (El-Batal *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017). Algunos estudios se han enfocado a la descripción de la actividad antimicrobiana y la hormesis bajo condiciones *in vitro*, en los cuales se han observado cambios en el desarrollo y aumento en la producción de biomasa (Parveen y Srinath, 2015; Spinoso-Castillo *et al.*, 2017; Bello-Bello *et al.*, 2017; Saha y Gupta 2018). El efecto hormético se caracteriza por la estimulación del crecimiento a dosis bajas y la inhibición en dosis altas (Iavicoli *et al.*, 2018).

Por otro lado, la concentración, tamaño, forma, composición química, reactividad, tipo de recubrimiento y los niveles de agregación de las NPsAg pueden afectar el desarrollo de las plantas (Cvjetko *et al.*, 2017; Pradas del Real *et al.*, 2017). Sin embargo, los mecanismos de absorción, translocación y acumulación de las NPsAg en plantas han sido poco estudiados y esclarecidos.

El desarrollo de nuevos métodos para caracterizar e identificar NPsAg en células y tejidos contribuiría a una mejor comprensión de los efectos potenciales durante el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. A la fecha, se han utilizado técnicas de microscopía para estudiar la asimilación y acumulación de NPs en plantas bajo condiciones *in vitro* (Geisler-Lee *et al.*, 2013; Cvjetko *et al.*, 2017).

El cultivo *in vitro* es una técnica que permite el estudiar el comportamiento de NPsAg en plantas de interés agrícola como estevia (*Stevia rebaudiana* B.). Actualmente, el cultivo de estevia ha incrementado su importancia en la industria alimentaria debido a

su alto contenido de esteviósidos utilizados como edulcorantes (Kovačević *et al.*, 2018).

La importancia de estudiar los mecanismos de transporte y efectos que pueden generar las NPsAg en plantas de interés comercial, ayudará a determinar los efectos que podría tener el uso de NPsAg en la aplicación de productos sanitizantes destinados a la agricultura. El objetivo de este estudio fue caracterizar las propiedades fisicoquímicas de NPsAg formuladas como Agrovit, así como estudiar el efecto de la concentración sobre el desarrollo de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) cultivada *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de nanopartículas de plata (NPsAg), así como el efecto de la concentración en la respuesta fisiológica de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) cultivada *in vitro*.

2.2 Objetivos particulares

Caracterizar las NPsAg (Argovit™) mediante microscopía multifotónica, y de transmisión.

Encontrar la mejor concentración de Argovit™ para número y longitud de brotes por explante, contenido de clorofila y producción de biomasa de estevia propagadas en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT).

Cuantificar la Ag⁺ metálica contenida en estevia después de la exposición a diferentes concentraciones.

Localizar fluorescencia de las NPsAg en hojas y tallos de estevia provenientes de cultivo *in vitro*.

Determinar el tipo de transporte vascular de los iones de Ag⁺ en estevia.

3. HIPOTESIS

Las nanopartículas de plata (NPsAg) afectan el desarrollo y crecimiento de plántulas *in vitro* de estevia (*Stevia rebaudiana* B.), debido al efecto hormético que generan a bajas dosis y a su bioacumulación en tejidos.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Estevia (*Stevia rebaudiana* B.)

Estevia (*Stevia rebaudiana* B.) es una planta originaria de la Zona Norte de la Región Oriental del Paraguay, herbácea de la familia asteraceae, la cual es conocida por sus propiedades edulcorantes (Brandle y Telmer, 2007). Estevia ha ganado un mayor interés industrial y científico en los últimos 20 años, representando una alternativa nutricional adecuada para la sacarosa y los edulcorantes artificiales (Kovačević *et al.*, 2018). Estevia es especialmente consumida por personas diabéticas con dietas estrictas (Karim *et al.*, 2015). Los estudios han sugerido que los glucósidos de steviol poseen beneficios terapéuticos con efectos antihiperoglucémicos, antihipertensivos, antiinflamatorios, antitumorales, antidiarreicos, diuréticos e inmunomoduladores (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009) En aplicaciones de nutrición humana y tecnología de alimentos, las hojas secas de estevia se usan como edulcorante debido a que es hasta 300 veces más dulce que la sacarosa común, pero con un valor calórico reducido de 2.7 kcal/g (Koubaa *et al.*, 2015).

Estevia está constituida con porcentajes de 80 a 85% de agua, aminoácidos, proteínas, fibra, lípidos, aceites esenciales, azúcares libres, vitaminas y ácidos orgánicos. La planta se considera una buena fuente de calcio, magnesio, potasio, hierro, fósforo, azufre, sodio y oligoelementos (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2013). Además, estevia contiene moléculas llamadas esteviósidos, los cuales son glicósidos compuestos por tres moléculas de glucosa unidas a una aglicona, la fracción de un steviol. Otros compuestos importantes característicos de estevia son los rebaudiósidos A, los cuales tienen una potencia de dulzor aún mayor que los esteviósidos (Barriocanal *et al.*, 2008).

Hoy en día, la estevia se cultiva en China, Japón, Corea, Taiwán, India, Bangladesh, Filipinas, Hawái, Malasia y en general en América del Sur para alimentos y productos farmacéuticos (Jain *et al.*, 2009). Se estima que anualmente, la población consume hasta 15,000,000 ton de endulzantes como el azúcar, lo que constituye hasta un 80%

de la producción mundial. Otro 8% (13,500,000 ton) de otras derivadas del maíz (*Zea mays L.*) y 12% de edulcorantes químicos (20, 250, 000 ton).

La propagación convencional de estevia, mediante semillas, muestra un porcentaje de germinación baja, menor al 10 % (Toffler y Orio, 1981). Esto es debido a la auto incompatibilidad que resulta en semillas estériles (Jagatheeswari y Ranganathan, 2012). Además, la propagación vegetativa de estevia no es fácil. Por lo tanto, el método de propagación convencional no es adecuado para la producción de estevia (Karim *et al.*, 2015). Una herramienta alternativa para propagar estevia en un corto periodo de tiempo, teniendo plantas genéticamente idénticas es el cultivo *in vitro* (Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu 2016).

4.2 Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos, embriones, protoplastos, o semillas en medio nutritivo *in vitro* bajo control ambiental y condiciones donde la temperatura, humedad, el fotoperiodo, la luz y los nutrientes son suministrados al ambiente de crecimiento (Bridgen *et al.*, 2018). De igual manera estas técnicas han sido adaptadas para su utilización en un amplio número de especies silvestres con problemas de propagación por métodos convencionales y/o con poblaciones extremadamente reducidas (Iriondo, 2001).

El CTV ofrece un gran número de ventajas para investigadores y productores para poder obtener mediante la micropropagación una gran producción de material vegetal. Estos procesos a diferencia de los cultivos convencionales, permiten a los investigadores realizar estudios en un menor tiempo posible y bajo condiciones controladas.

El proceso de micropropagación incluye una serie de pasos, desde el cuidado de la planta madre, pasando a un establecimiento mediante la selección de explantes y esterilización, la elaboración de medios de cultivo para multiplicar y enraizar para finalmente aclimatizar las plantas obtenidas (Butt *et al.*, 2015). Sin embargo, el proceso tradicional de micropropagación, que se basa en un medio gelificado no escalable,

requiere mucha mano de obra y grandes cantidades de contenedores individuales (Takayama y Akita 2006). Debido a estas desventajas y buscando mejorar los procesos de micropropagación se han desarrollado los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT).

4.3 Micropropagación en Sistemas de Inmersión Temporal

La micropropagación es un método alternativo efectivo de propagación asexual, factible en poco tiempo y utiliza espacio limitado que permite la producción de plantas, durante todo el año (Sivanesan *et al.*, 2007). El medio de cultivo líquido tiene muchas ventajas, pero resulta tener muchos problemas en cuanto a la menor proporción de oxígeno y una respuesta de hiperhidricidad de las plantas debido a la exposición prolongada, por lo que se ve afectado el crecimiento de las plantas. Los (SIT) pueden resolver estos problemas a través de la frecuencia de inmersión, utilizando medios de cultivo líquidos y facilitando el desarrollo de los procesos a gran escala. Además, se reducen los costos de producción ya que se elimina por completo el agente gelificante en los medios semisólidos y genera un aumento de la productividad del material propagado (Berthouly y Etienne 2005; Mehrotra *et al.*, 2007; Bello-Bello *et al.*, 2014).

Un ejemplo de estos SIT, y siendo uno de los primeros desarrollados, es el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT®), desarrollado por Escalona *et al.* (1999), el sistema consta de dos contenedores (frascos de boca ancha, botes o jarras), conectados entre sí por un tubo en U (vidrio o plástico) o un tubo de silicona (Figura 1). Uno de los contenedores tiene la función de una cámara de cultivo, mientras que el otro contenedor se usa como un tanque de almacenamiento de medio de cultivo. Cada contenedor está conectado a su propia línea de aire presurizado, controlada por dos temporizadores de reloj independientes (Escalona *et al.*, 1999; Georgiev *et al.*, 2014).

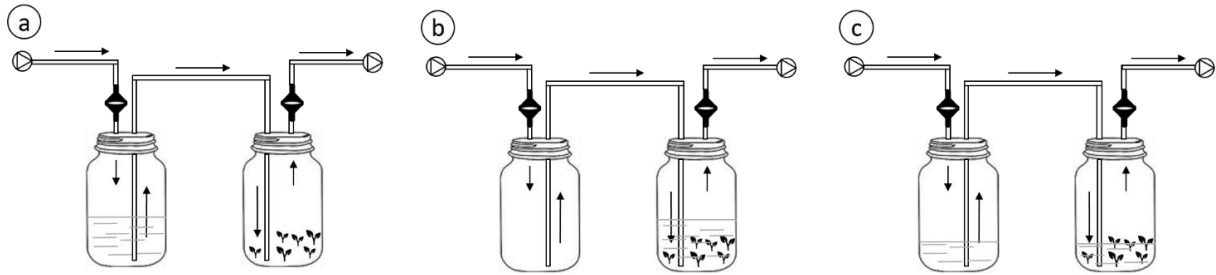


Figura 1. Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT®). **(a)** Apertura de válvula solenoide, y el aire comprimido fuerza el medio al contenedor de la planta. **(b)** Las plantas son sumergidas en el medio de cultivo. **(c)** Después de un período de tiempo, se abre una segunda válvula solenoide y la presión del aire obliga al medio a regresar al contenedor original. (Modificado de Escalona *et al.*, 1999).

4.4 Nanotecnología y Nanopartículas

La nanotecnología es la ciencia encargada del estudio de las propiedades físicas, químicas y biológicas de la materia, las cuales van de 1 a 100 nm y tiene sus aplicaciones en el bienestar del ser humano (Holdren, 2011). Desde hace varios años, la nanotecnología ha ido adentrándose en diversas áreas de la vida desde la industria, los alimentos, la medicina entre otros (Kokura *et al.*, 2010, Singh *et al.*, 2008 Tiede *et al.*, 2008).

Las nanopartículas (NPs) artificiales pueden estar basadas en carbono o basadas en metales (Peralta-Videa *et al.*, 2011). Las NPs a base de carbono se dividen en fullerenos y nanotubos de carbono. En cuanto a los NPs metálicas se agrupan en metales, óxidos metálicos y puntos cuánticos. Entre las NPs metálicas más producidas y usadas están las de óxido de zinc (ZnONPs), dióxido de titanio (TiO₂NPs), oro (AuNPs), plata (NPsAg), óxido de cerio (CeO₂NPs) y NP de cobre (CuNPs) (Keller *et al.*, 2013).

4.4.1 Características de las partículas

Para poder conocer las características y propiedades de una partícula es necesario realizar una caracterización que nos permita analizar las propiedades físicas y

químicas que permita entender su función dentro de los organismos vegetales. Según Patel *et al.* (2015), la caracterización de nanomateriales, y en su caso de NPsAg, puede realizarse mediante Espectrometría de UV/Visible, Espectroscopia de fotoluminiscencia (PL), Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier, Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), Análisis de Rayos X Dispersivo de Energía (AXDE), Análisis Dinámico de Dispersión de Luz (DDL), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) entre otras.

En un estudio realizado para la evaluación del efecto genotóxico de NPsAg en haba (*Vicia faba*) los autores caracterizaron sus NPsAg mediante MET para la determinación de morfología, diámetro. Como resultado, obtuvieron que las NPsAg eran principalmente de forma esférica, y observaron que, de un total de 300 partículas, los diámetros longitudinales tenían una media de 63 ± 41 nm y una media de diámetro lateral de 36 ± 21 (Platlolla *et al.*, 2012). En la Figura 2, se muestra una fotografía obtenida en Microscopio Electrónico de Transmisión MET.

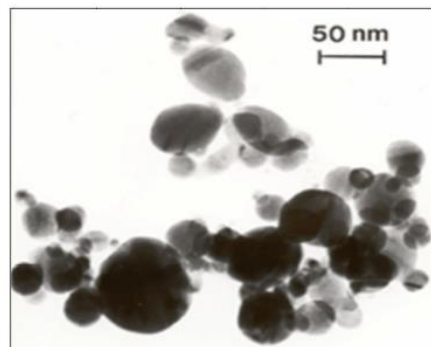


Figura 2. Nanopartículas de plata observadas mediante MET. (Tomada de Platlolla *et al.*, 2012).

4.4.2 Análisis Digital de Imágenes

El Análisis Digital de Imágenes (ADI), se puede definir como el proceso de extraer información cualitativa y cuantitativa a partir de imágenes digitales mediante varias técnicas de Procesamiento y Análisis de Imágenes (PAI) asistidas por computadora (Cherian y Arnepalli 2016). El análisis de imágenes tiene una amplia gama de

aplicaciones en diferentes áreas como lo son sensores remotos, almacenamiento de imágenes y datos para transmisión en aplicaciones comerciales, imágenes médicas, imágenes acústicas y seguridad, entre muchos otros (Guada *et al.*, 2016).

Algunos softwares comerciales utilizados para el ADI, son Imaris de Bitplane, Amira de Mercury Computer Systems, Volocity de Improvion, MetaMorph de Molecular Devices y Matlab Image Processing de MathWorks, los cuales son principalmente para análisis de imágenes con propósito general para imágenes de microscopía (Wang *et al.*, 2010).

El software Image J, se ha sido utilizado para diferentes aplicaciones como el análisis de la distribución de fluorescencia (He *et al.*, 2010), mediciones de organelos (Grigorova *et al.*, 2012) y para determinar tamaños y formas de partículas (Margriet *et al.*, 2011).

El ADI ha sido utilizado para determinar diámetros promedio de nanoestructuras. Li *et al.* (2016), sintetizaron nanocristales de óxido de hierro (Fe_3O_4) y mediante el software ImageJ, determinaron tamaños de entre 8 a 30 nm, además demostraron presencia de nanocristales con morfología octaédrica.

4.5 Nanopartículas de Plata

En la naturaleza, la plata (Ag) puede estar presente en cuatro estados de oxidación diferentes: Ag^0 , Ag^1 , Ag^2 y Ag^3 . En el medio ambiente, la Ag se encuentra como un ion monovalente junto con el sulfato, bicarbonato o sulfato o más compleja con cloruros y sulfatos adsorbidos sobre la materia particulada en la fase acuosa (Chopra, 2007).

La plata, a lo largo de la historia, se ha usado continuamente en medicina por sus propiedades antibacterianas. Ahora es común encontrar Ag en diversos productos como en telas, en materiales quirúrgicos, desodorantes, pasta de dientes, juguetes, humidificadores y mucho más; con fines asépticos para evitar en desarrollo de bacterias no deseadas (Alarcon *et al.*, 2012). Sin embargo, también se ha considerado

que la Ag es un estimulador de crecimiento de plantas efectivo, que incluye nitrato de plata (AgNO_3), silicato y un polímero soluble en agua (Sharon *et al.*, 2010). Con el rápido desarrollo de la nanotecnología, las aplicaciones se han ampliado aún más y ahora la Ag es el nanomaterial de ingeniería más comúnmente utilizado en productos de consumo (Rejeski, 2009).

4.5.1 Propiedades y aplicaciones de las NPsAg en el CTV

La determinación de las propiedades físicas y químicas de las NPsAg, incluidas la química de superficie, el tamaño, forma, morfología de partícula, aglomeración, composición de partículas, recubrimiento, velocidad de disolución, distribución de tamaños, reactividad de partículas en solución, eficacia de liberación de iones, tipo de célula y finalmente tipo de los agentes reductores utilizados para la síntesis son factores cruciales para la determinación de la citotoxicidad (Carlson *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Gliga *et al.*, 2014).

Las aplicaciones biológicas de NPsAg, según Zhang *et al.* (2016), va desde la actividad antibacteriana, actividad antifúngica, actividad antiviral, actividad antiinflamatoria, actividad anti-angiogénica, actividad anticancerígena, diagnóstico, elaboración de biosensores y terapia en la aplicación de genes.

En el campo de la agricultura, la aplicación más importante de NPsAg está relacionada con su acción antimicrobiana y nutricional (Iavicoli *et al.*, 2018). Se han desarrollado agroquímicos nanoencapsulados, los cuales, debido a su alta solubilidad, estabilidad y eficacia son reemplazados por agroquímicos comunes que necesitan varias aplicaciones foliares. Algunas características de estos nanomateriales, como el tamaño diminuto, la fácil penetración en la cutícula, su nula volatilidad y la capacidad de liberar lentamente sus ingredientes activos, causaron su uso extensivo en la agricultura; también se ha demostrado que las NPsAg prolongaron la vida útil especies ornamentales, como gerbera, muy probablemente debido a su actividad antimicrobiana (Solgi *et al.*, 2009).

En el CTV, es posible encontrar numerosos trabajos que involucren el uso de las nanopartículas (NPs) incluyendo las NPsAg. Las cuales se han utilizado ampliamente para mejorar la germinación de la semilla, mejorar el crecimiento y el rendimiento de las plantas, permitir la modificación genética de las plantas, mejorar la producción de compuestos bioactivos y lograr protección de plantas (Wang *et al.*, 2016; Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2017).

Las propiedades antimicrobianas de las NPsAg han sido ampliamente usadas en plantas *in vitro* (Mahna *et al.*, 2013; Arab *et al.*, 2014). Sin embargo, recientemente algunos autores, han evaluado si las NPsAg tienen un efecto hormético en la multiplicación de plantas *in vitro* (Bello-Bello., 2017; Spinoso-Castillo *et al.*, 2017). Demostrando que bajas dosis utilizadas de NPsAg pueden favorecer el desarrollo de plantas de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) y caña (*Saccharum* spp.).

Se ha demostrado que plantas de interés comercial crecen normalmente en suelos con alta concentración de plata, mientras que el crecimiento y desarrollo de otras plantas se ven afectados negativamente (Handy *et al.*, 2008; Juárez-Maldonado *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017). En la siguiente tabla (Tabla 1) es posible observar algunas aplicaciones de NPsAg en el CTV.

Tabla 1. Estudios que demuestran efectos favorables del uso de NPsAg en plantas *in vitro*.

Tipo de Nanopartículas	Características	Modelo Vegetal	Resultados	Referencia
Argovit (NPsAg recubiertas por PVP)	Esféricas 35±10 nm.	Brotos de Vanilla (<i>vanilla planifolia</i>)	El número de brotes por explante incrementó en 25 y 50 mg/L. Longitud de brotes a 25 y 50 mg/L obtuvo valores promedio de 14.33 y 14.89 cm.	(Spinoso-Castillo <i>et al.</i> , 2017)
NPsAg	Esféricas 10 a 30 nm.	Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) y Maíz (<i>Zea mays</i>)	Longitud de raíz; peso fresco y seco; área de la hoja; contenido de clorofila y carbohidratos: aumentaron con concentraciones de hasta 60 mg/L.	(Salama <i>et al.</i> , 2012)
Argovit (NPsAg recubiertas por PVP)	Esféricas 35±10 nm.	Brotos de Caña de azúcar (<i>Saccharum spp</i>)	50 y 100 mg/L de NPsAg promovió el número de brotes (aumentando en un 35% y 28%, respectivamente) y la longitud (aumentó en un 52% y un 48%, respectivamente). La concentración más alta de Ag-NP (250 mg/L) causó una reducción en el número y la longitud del brote.	(Bello-Bello <i>et al.</i> , 2017)
NPsAg	10-20 nm.	Trigo (cv. NARC-2009)	NPsAg a 25 y 50 mg/L área de hoja máxima significativamente mejorada (19.7 y 18.18 cm ² , respectivamente, frente a 15 cm ² en controles.	(Jhanzab <i>et al.</i> , 2015)

Abreviaciones: NPsAg, Nanopartículas de Plata; PVP, Polyvinylpyrrolidona. Modificado de (Iavicoli *et al.*, 2018)

4.7 Transporte de nanomateriales en vegetales

Illya *et al.* (2017), proponen que los nanomateriales pueden ser tomados por raíces en forma de iones (átomos cargados) y los transportan a través de los espacios extracelulares de las células adyacentes (vía apoplástica). En otra ruta, los iones se transportan a través de las membranas celulares mediante transportadores específicos (portadores y bombas) y se mueven a través del citoplasma de célula a célula (vía simpática). Las partículas también parecen ser absorbidas a través de estas vías hasta ser transportadas hasta la endodermis (una capa de células que rodea el sistema de transporte de la planta, también llamado sistema vascular), que tiene una barrera llamada la banda de Caspary. Esta barrera limita la entrada de agua y solutos en el xilema, que es el tejido vegetal responsable del transporte de agua y nutrientes disueltos. Una vez que las sustancias atraviesan la endodermis, el movimiento ascendente de larga distancia hacia el sistema aéreo ocurre a través del xilema, donde los tejidos especializados transportan tanto agua como sales minerales a las hojas.

Por otro lado, Medina-Velo *et al.* (2017) coinciden con los autores anteriormente mencionados y proponen un esquema, en el cual se explican los dos procesos que involucran el movimiento de los elementos dentro de las plantas, estos son la captación, que es la adquisición de la raíz de los elementos del suelo y el transporte, o la translocación de los elementos de las raíces a los tejidos superficiales (Figura 3). Para esto, se apoyaron en un experimento realizado por Wang *et al.* (2012), quienes estudiaron plantas de maíz de un mes de edad, expuestas a NPs de Óxido de Cerio (CeO_2) teñidos con isotiocianato, un colorante fluorescente de uso común, y los tejidos se observaron con un microscopio confocal.

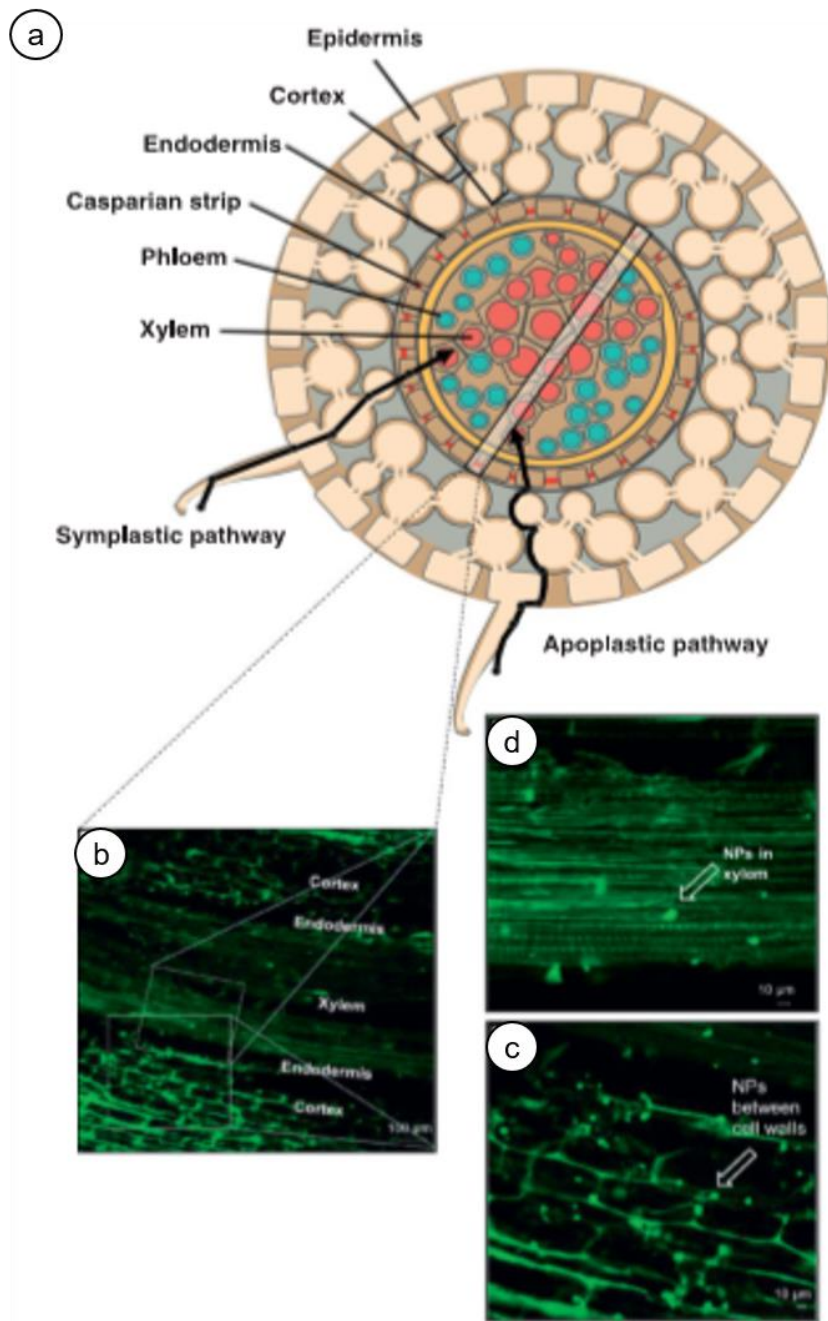


Figura 3. Captación y transporte de Nanopartículas. **(a)** Diagrama de la estructura de la raíz que muestra las vías apoplásticas (a través de las paredes celulares, tejidos no vivos) y simpláptica (a través de las membranas plasmáticas de las células, tejidos vivos) para el transporte de solutos. **(b)** Imagen confocal de raíz de maíz tratada con nanomateriales diseñados con isotiocianato de fluoresceína CeO₂. **(c)** Agregados de CeO₂ distribuidos a través de las paredes celulares en la corteza. **(d)** agregados de NPs de CeO₂ dentro del xilema. (Modificado de Medina-Velo *et al.*, 2017).

4.8 Uso de microscopía para localización de NPsAg en vegetales

La microscopía electrónica ha sido utilizada para la detección de nanomateriales en tejidos de plantas. Algunas de estas técnicas son la Microscopía Electrónica de barrido (SEM), la microscopía electrónica de transmisión (MET) (Stampoulis *et al.*, 2009; Dudkiewicz *et al.*, 2011), la microscopía de excitación de dos fotones (Wild y Jones., 2009) y la microscopía confocal de escaneo láser (Geisler-Lee *et al.*, 2012).

Geisler-Lee *et al.* (2012), expusieron semillas de *Arabidopsis thaliana* a NPsAg con tres diferentes tamaños; 20, 40 y 80 nm. Utilizando un microscopio confocal de escaneo láser Zeiss LSM 510, localizaron NPsAg y Ag en puntas de raíz de *Arabidopsis thaliana* y así determinaron el efecto de las NPsAg en tres niveles: toxicidad fisiológica, acumulación celular y transporte subcelular (Figura 4). En sus resultados, reportan que las NPsAg de 40 nm parecían unirse a las células del borde de las raíces de *Arabidopsis*, además muestran que después de 1 semana, las NPsAg pueden detectarse en las células de la columela de la punta de la raíz y en la segunda semana, las NPsAg aparecieron agregados a lo largo de todo el límite de raíz lateral.



Figura 4. Localización de plata en raíces de *Arabidopsis thaliana* de dos semanas de edad, imágenes de microscopía confocal de barrido láser y tomadas en un campo claro para mostrar las capas de las células; las señales verdes son reflexión de elementos plateados. **(a)** control; **(b-d)** se tratan con nanopartículas de plata de 20 nm (NPsAg) de 66.8, 133.68.267.36 mg/L. (Modificado de Geisler-Lee *et al.*, 2012).

En un estudio realizado por Laure *et al.* (2014), mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se analizó la internalización de NPsAg en hojas de lechuga (*Latuca sativa*) tras cierto tiempo de exposición a dichas partículas antes y después de un lavado (Figura 5) se observó acumulación de Ag⁺ en tejido epidérmico de hoja. Se determinó también, que la Ag penetró el tejido de la hoja y se almacenó en la epidermis de esta.

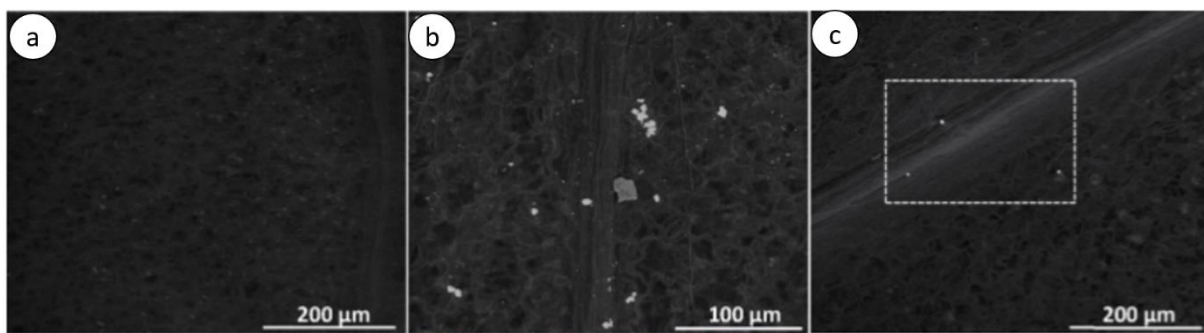


Figura 5. Efecto en el lavado, análisis mediante SEM de la superficie de las hojas de lechuga. **(a)** control de hojas de lechuga, **(b)** hojas expuestas a 100mg/L de NPsAg antes del lavado y **(c)** hojas de lechuga expuestas a NPsAg después de un lavado. (Modificado de Larue *et al.*, 2014).

4.9 Cuantificación de Plata (Ag) en un sistema vegetal

A medida que las plantas absorben NPs de diversos tamaños, son translocadas a los brotes y tienden a acumularse en partes aéreas de las plantas (Mónica y Cremonini, 2009). Después de la acumulación, se comienza a degradar la calidad de los cultivos, baja la tasa de germinación de las semillas, disminuye la biomasa además se reduce la longitud de las raíces y brotes, se alteran los procesos de fotosíntesis, y baja la tasa de transpiración, ocurren daños a nivel ADN, inician procesos de peroxidación, se activan genes relacionados con el estrés y finalmente ocurren procesos de apoptosis o muerte celular (Shen *et al.*, 2015; Hossain *et al.*, 2016).

La espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) ha sido empleado como herramienta para determinar el contenido de metales en el

suelo y en muestras de plantas con gran precisión (Tighe *et al.*, 2004). Algunos autores como Zhang *et al.* (2012) adicionaron soluciones de NPsAg (0, 35.6, 92.9, 200.7 297.3, 419.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) a cortes de peras (*Pyrus*). Utilizando, la ICP-PES, determinaron la concentración de Ag en frutos. Se detectaron 45.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de plata en las muestras control, debido a que las cantidades de rastros de plata pueden estar presentes de forma natural en las peras gracias a la adsorción de plata del agua y el suelo. Los valores más altos se encontraron en la adición de 419.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con. Además, estos autores determinaron que existe una relación lineal entre los valores agregados y los valores predichos por ICP-OES, y es evidente que los valores recuperados de las NPsAg estaban todos muy cerca de los valores enriquecidos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ubicación del área de trabajo

La investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de CTV del Colegio de Posgraduados-Campus Córdoba, Km. 348 Carretera Federal Córdoba-Veracruz, C.P. 94946. Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. Localizado geográficamente a 19° 27' latitud N y 98° 53' longitud O, a 720 msnm. El cual cuenta con la certificación fitosanitaria ante el Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA-Certificado:01-016-2/COLPOS/2018). Esta certificación acredita al laboratorio para la micropropagación de plántulas libres de plagas y enfermedades manteniendo las buenas prácticas de laboratorio y cuidados con el medio ambiente bajo normas de seguridad e higiene.

5.2 Estrategia experimental

Para la realización de esta investigación, se realizaron diversas metodologías las cuales se resumen en la Figura 6.

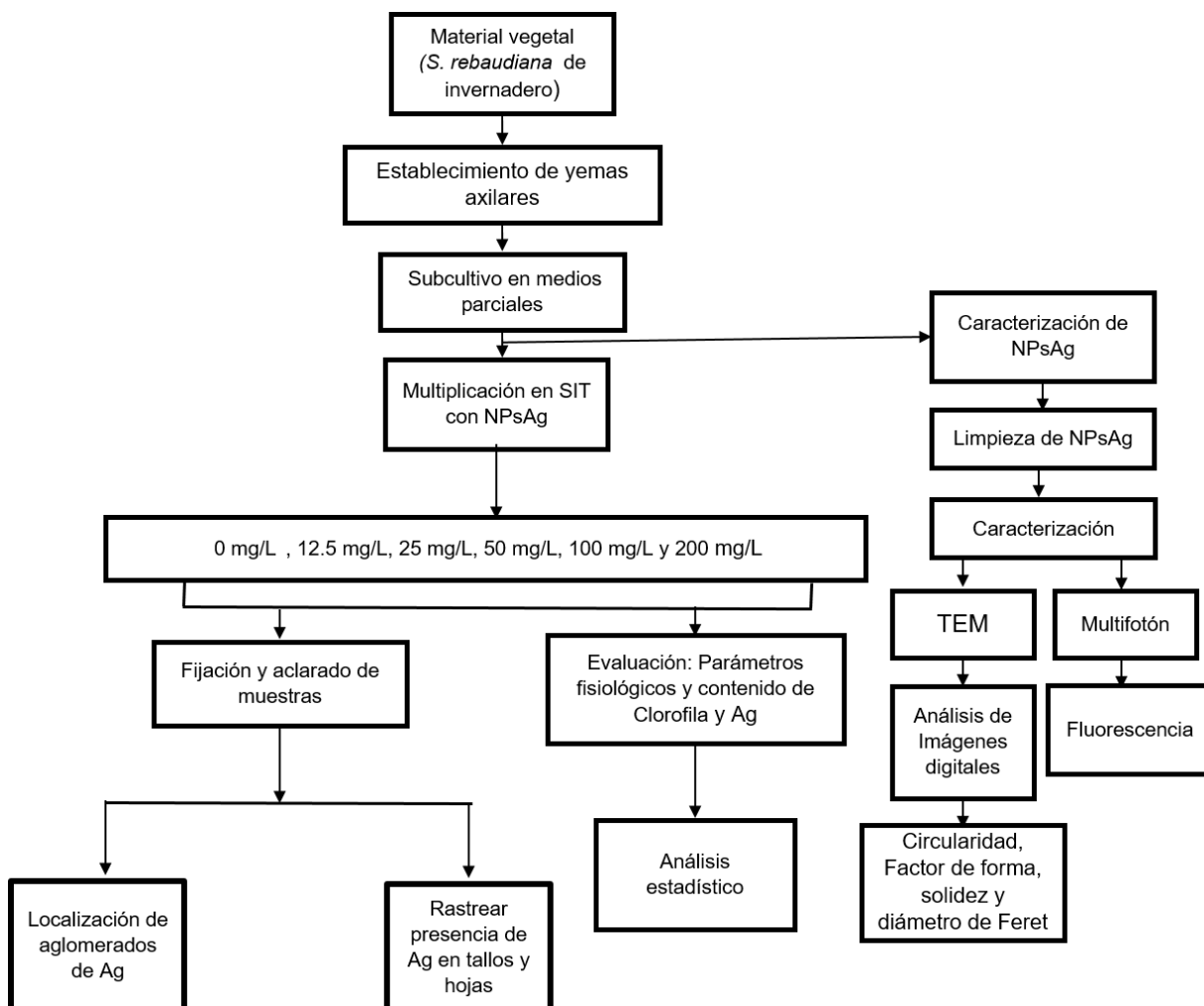


Figura 6. Estrategia experimental

5.3 Caracterización de nanopartículas de plata

Formulación de nanopartículas de Plata. Las NPsAg utilizadas en este estudio, formuladas como Argovit®, fueron proporcionadas por el Production Centre Vector-Vita Ltd, localizado en Novosibirsk, Russia. Argovit está conformada por 12 mg/mL de plata metálica y 188 mg/mL de polivinilpirrolidona (PVP, 15-30 kD) disueltas en agua desionizada una concentración de 200 mg/mL (20%). La caracterización de propiedades fisicoquímicas se realizó a partir de una fracción de NPsAg de Argovit, la cual se precipitó mediante centrifugación a 11,000 rpm durante 10 min. Posteriormente

se retiró el PVP y se resuspendió con acetona al 70%. Este ciclo de lavado se realizó tres veces y en el último paso se resuspendió con agua desionizada.

Caracterización mediante microscopia electrónica. La caracterización morfológica y morfométrica de las NPsAg se realizó mediante un microscopio electrónico de transmisión (Morgagni M-268, Philips/FEI, Holanda). Para el estudio morfológico se depositaron 5 μ L de NPs en una rejilla de cobre 300 mesh recubiertas de formvar/carbón (Electron Microscopy Science, PA). La muestra se dejó incubar durante 10 minutos y se retiró el excedente, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente. Las condiciones de operación del microscopio fueron en alta magnificación 140,000X a alto voltaje 80 kV (EHT) y presión de la columna 5×10^{-3} Pa (5×10^{-5} Torr). Todas las micrografías fueron capturadas en formato .TIFF con un tamaño de 1376 x 1032 pixeles en escala de grises. En este formato, 0 corresponde a los pixeles negros y 255 al blanco. Los descriptores morfométricos evaluados fueron circularidad, factor de forma, solidez y diámetro efectivo (Bouwman *et al.* 2004).

5.4 Material vegetal y establecimiento *in vitro*

Se colectaron segmentos nodales de 3 cm de longitud de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) cv. Morita II provenientes de invernadero. Los explantes se desinfectaron en una solución surfactante (dos gotas de Tween-20 en 1 L de agua destilada) y se lavaron con un flujo lento de agua corriente durante 30 minutos. Posteriormente, en campana de flujo laminar se sumergieron en etanol al 70% (v/v) por 30 s y en hipoclorito de sodio al 0.6% y 0.3% (v/v) por 10 y 5 min, respectivamente. Se realizaron tres enjuagues con agua estéril. Finalmente, los explantes se sembraron en tubos de ensaye. Cada tubo contenía 10 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2 mg/L de 6-Benzylaminopurine (BAP) (Sigma-Aldrich® Chemical Company, St. Louis, MO) adicionado con 2.5 g/L de Phytigel® como agente gelificante. El medio de cultivo se esterilizó 120° C a 115 kPa durante 20 min. El periodo de incubación fue a $24 \pm 2^{\circ}$ C y se mantuvieron bajo luz fluorescente ($40-50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) con un fotoperiodo de 16 h.

5.5 Efecto de NPsAg durante la multiplicación de brotes

Después de dos subcultivos en medios semisólido, se colocaron 10 explantes en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT[®], Escalona *et al.* 1999) con un volumen de 1 L, conteniendo 500 mL de medio MS líquido suplementado con 2 mg/L de (BAP). Después de esterilizar el medio se añadieron diferentes concentraciones de NPsAg (0, 12.5, 25, 50, 75, 100 mg/L) utilizando tres BIT por tratamiento. Todo el experimento se realizó por triplicado. A los 30 d de cultivo se evaluó el número de brotes por explante, longitud de los brotes por explante y la materia seca. El contenido de materia seca se calculó utilizando peso seco / peso fresco x 100. El peso seco se determinó después de colocar los brotes de estevia en una estufa de secado a una temperatura de 65°C durante 72 h.

5.6 Contenido de clorofila

La determinación del contenido de clorofila a, clorofila b y clorofila total se determinó en hojas de acuerdo a la metodología propuesta por Harborne (1973). Para cada tratamiento, se pesaron 0.2 g de masa fresca y se maceraron con un mortero utilizando acetona (Sigma-Aldrich[®] Chemical Company, St. Louis, MO) al 80%. Las muestras fueron llevadas a una temperatura de -4°C durante 24 h. La mezcla se aforó a 6.25 mL con acetona al 80%, y se filtró con papel whatman número 41. Finalmente, se realizaron lecturas de absorbancia utilizando un Espectrofotómetro (Genesys 10S, Thermo Scientific, MA, USA) a 663nm (clorofila a) y 645nm (clorofila b). Para obtener contenido de clorofila a, b y total se calcularon a través de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila a (C)} = \frac{[(12.7 * A_{663}) - (2.59 * A_{645})](V)}{(1000 * P)}$$

$$\text{Clorofila b (C)} = \frac{[(22.9 * A_{645}) - (4.70 * A_{663})](V)}{(1000 * P)}$$

$$\text{Clorofila total (C)} = \text{Clorofila a} + \text{Clorofila b}$$

Donde:

A = Absorbancia.

C = Concentración (mg/L FW).

V = Volumen de aforado (m/L).

P = Peso de muestra (g).

1000 = Factor de conversión.

5.7 Mediciones del contenido de Plata total

La determinación del contenido de plata metálica se realizó por Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente por sus siglas en inglés (ICP-MS). Se tomaron brotes de masa fresca de los diferentes tratamientos con NPsAg. Las muestras de tejido fresco fueron lavadas con agua corriente durante 15 min y colocadas en una estufa de secado a una temperatura de 65°C durante 72 h siguiendo el protocolo descrito por Alcantar y Sandoval (1999). Se pesaron 250 mg de tejido seco por muestra y fueron sumergidas a una solución de H₂SO₄:HClO₄ (2:1,v:v). Posteriormente, las muestras fueron llevadas a un volumen de 25 mL con agua desionizada. Finalmente, las muestras se filtraron y los extractos de la digestión se leyeron por ICP-MS (Varian ICP OES 725-ES; Mulgrave, Australia).

5.8 Evaluación de la deposición de NPs en tejidos

Microscopio Multifotón. La detección del espectro de emisión de las NPsAg y la visualización de la deposición en tejidos de estevia se realizó a través de un sistema híbrido de microscopía multifotónica (Axio Imager Z2, LSM 880-NLO, Zeiss, Alemania) acoplado a laser infrarrojo de Ti:Zafiro (Chamaleon visión II, COHERENT, Escocia) con capacidad de sintonización en rangos de 690 a 1060 nm. Las condiciones de operación en todos los experimentos fueron usando el láser Chamaleon a 900 nm con 1.2% de potencia, pinole a 601.1 y rangos de voltaje de los fotodetectores en condiciones similares. Las reconstrucciones de hojas y tallo se llevaron a cabo en un

objetivo de 20X/0.5, NA ∞ -0.17, Zeiss Plan NEOFLUAR y las observaciones a altas magnificaciones se realizaron usando un objetivo de inmersión de 63X/1.3, NA ∞ -0.17, Zeiss Plan NEOFLUAR. La fluorescencia específica de las NPsAg se obtuvo a través del método de escaneo en "Lambda" permitiendo la detección de fotones en el espectro de emisión de 398 a 719 nm, con una sensibilidad espectrales de 5 nm. Todas las micrográficas fueron capturadas en formato.CZI en un tamaño de 1131x1131 pixeles compuesto por tres canales de color (RGB).

Microscopía de Fluorescencia. La identificación de NPsAg se realizó en tallos y hojas de estevia. Se disectaron segmentos de tallos intermodales y se hicieron cortes transversales con la técnica de mano libre, mientras que en el caso de las hojas se tomaron muestras completas y ambos tejidos se fijaron en una solución FAA (por sus siglas en inglés) preparada con 100 mL de formaldehído, 50 mL de ácido acético glacial, 500 mL de etanol al 96° y 350 mL de agua destilada, incubándose durante 24 h. Posteriormente, las muestras fueron lavadas tres veces con solución tampón de fosfatos a 0.16 M, pH 7.4. Las muestras se colocaron en etanol al 50% durante 3 h. Después de este tratamiento, las muestras fueron sumergidas en etanol, agua y glicerina (1:1:2) durante 3 horas y colocadas en etanol y glicerina 1:1 durante 12 h. Finalmente, para eliminar toda la clorofila, se realizaron tres lavados con etanol al 70%, 80% y 100% durante una hora de incubación y enjugaron con solución tampón de fosfatos y agua desionizada. Los cortes trasversales del tallo y las hojas se fijaron en un portaobjetos con agua desionizada cubrieron con un cubreobjetos de alta transparencia ("Zeiss cover glasses" D=0.17 mm +/- 0.005 mm, índice de refracción= 1.5255 +/- 0.0015, Número de Abbe= 56 +/-2). Para determinar la fluorescencia emitida por las NPsAg se utilizaron las mismas condiciones de escaneos descritos en la sección de microscopia multifotón.

5.9 Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de una vía y los medios se compararon con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) usando SPSS v. 22 para Windows. La transformación de Arcoseno se realizó para los

datos experimentales tomados en porcentajes antes de someterlos a análisis estadístico.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Características fisicoquímicas de Argovit

Las características fisicoquímicas de las NPsAg se resumen en la Tabla 2. Las NPsAg caracterizadas por MET se muestran de forma circular, con 0.82 de factor de forma (*sf*) y una redondez de 0.88. El análisis de las dimensiones de NPsAg mostró diámetros promedio de 35 ± 15 nm, que es plata funcionalizada con PVP (Fig. 7 a-b). El análisis espectral de las NPsAg permitió encontrar el mayor pico de fluorescencia a 427 nm del espectro electromagnético de luz (Fig. 7c).

Tabla 2. Características fisicoquímicas de Argovit.

Propiedades	Media
Contenido de Ag metálica (%wt)	1.2
Contenido de PVP (% wt.)	18.8
Factor de Forma (Esferoidales)	0.82
Diámetro promedio de nanopartículas de plata mediante MET (nm)	35 ± 10
Redondez	0.88
Intervalo de tamaño de partículas de plata metálica por MET (nm)	1 a 80
Potencial zeta (mV)	-15
Fluorescencia	427 nm

Abreviaciones: Ag, plata; PVP, polyvinylpyrolidona; MET, Microscopio Electrónico de Transmisión.

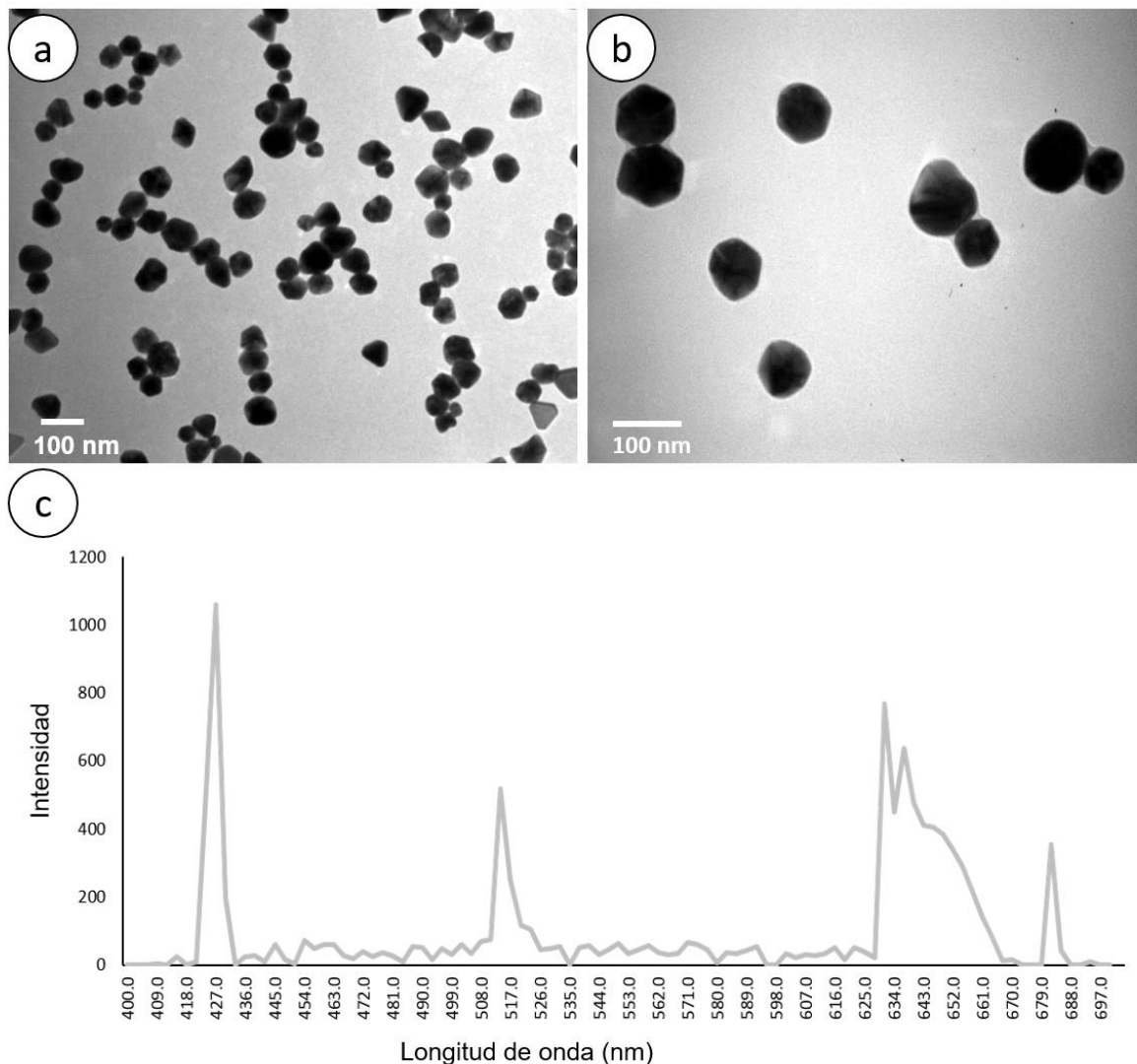


Figura 7. Nanopartículas de plata observadas por MET usando diferentes magnificaciones. **(a-b)** Barra=100nm y **(c)** Espectro de emisión de fluorescencia de NPsAg obtenida por microscopia multifotón.

En este estudio, los resultados por MET permitieron caracterizar la forma y tamaño de Argovit. Se sabe que las partículas de plata esféricas no emiten fluorescencia en el espectro rojo, ya que sus propiedades de dispersión se pueden adaptar de acuerdo a su tamaño, forma y composición (Rongchao, 2001). Al obtener picos de fluorescencia en 427, 514 y 531 nm, se sugiere que en la solución de Argovit se encuentran diversos tamaños y formas de NPsAg. Además, se ha reportado que NPsAg más pequeñas son más tóxicas en vegetales (Panzarini *et al.* 2018). De acuerdo con Geisler-Lee *et al.*

(2013) y Gorka *et al.* (2015) la toxicidad de las NPsAg depende del tamaño, forma, recubrimiento y concentración de Ag⁺ adicionada.

6.2 Efecto de NPsAg en la multiplicación *in vitro*

Al evaluar el efecto de las NPsAg sobre la regeneración *in vitro* de estevia se observaron diferencias significativas entre las variables evaluadas (Fig. 8). La aplicación de 12.5, 25 y 50 mg/L de NPsAg promovió la mayor producción y longitud de brotes por explante; mientras que el tratamiento control y 200 mg/L NPsAg presentaron la menor producción y longitud de brotes (Fig. 9). La materia seca incremento gradualmente a partir de 25 mg/L de NPsAg, obteniendo los valores más altos en las concentraciones de 100 y 200 mg/L de NPsAg, con 9.7 y 9.9 en materia seca, respectivamente. Los resultados obtenidos en la cuantificación de Ag mostraron diferencias significativas. De manera general, se observó un incremento en el contenido de Ag en tejidos a medida que aumentaron las concentraciones de NPsAg en el medio de cultivo. El menor contenido de Ag se observó en el tratamiento control sin NPsAg, obteniendo 0.13 µg/g peso seco (ps) de Ag, mientras que el mayor contenido de Ag se observó en los tratamientos con 100 y 200 mg/L de NPsAg, con 95.23 y 188.16 µg/g ps de Ag, respectivamente.

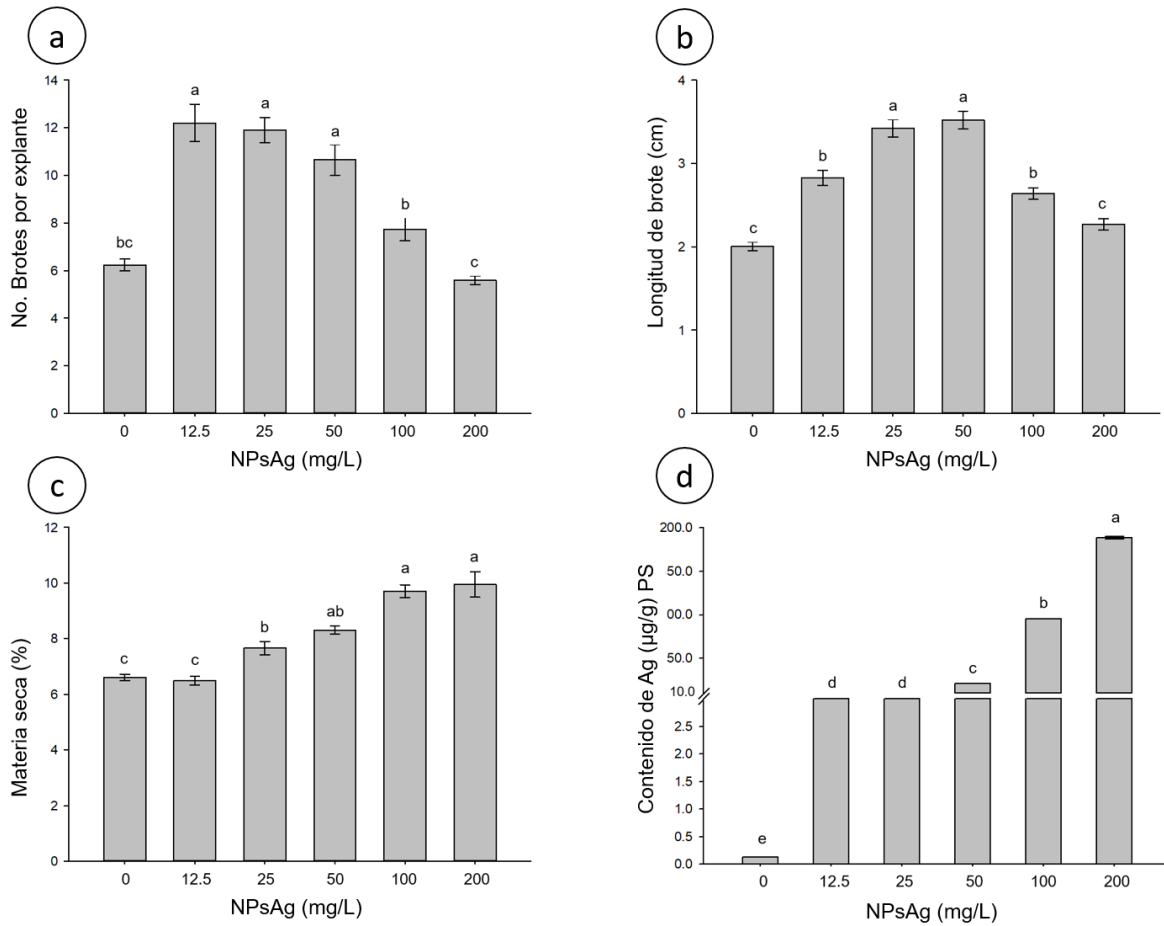


Figura 8. Efecto de NPsAg en la regeneración *in vitro* de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) **(a)** número de brotes por explante, **(b)** longitud de brote, **(c)** materia seca y **(d)** determinación de contenido de Ag en brotes de estevia expuestos a Argovit. Media \pm error estándar dentro de una barra seguida de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey en ($P \leq 0.05$).

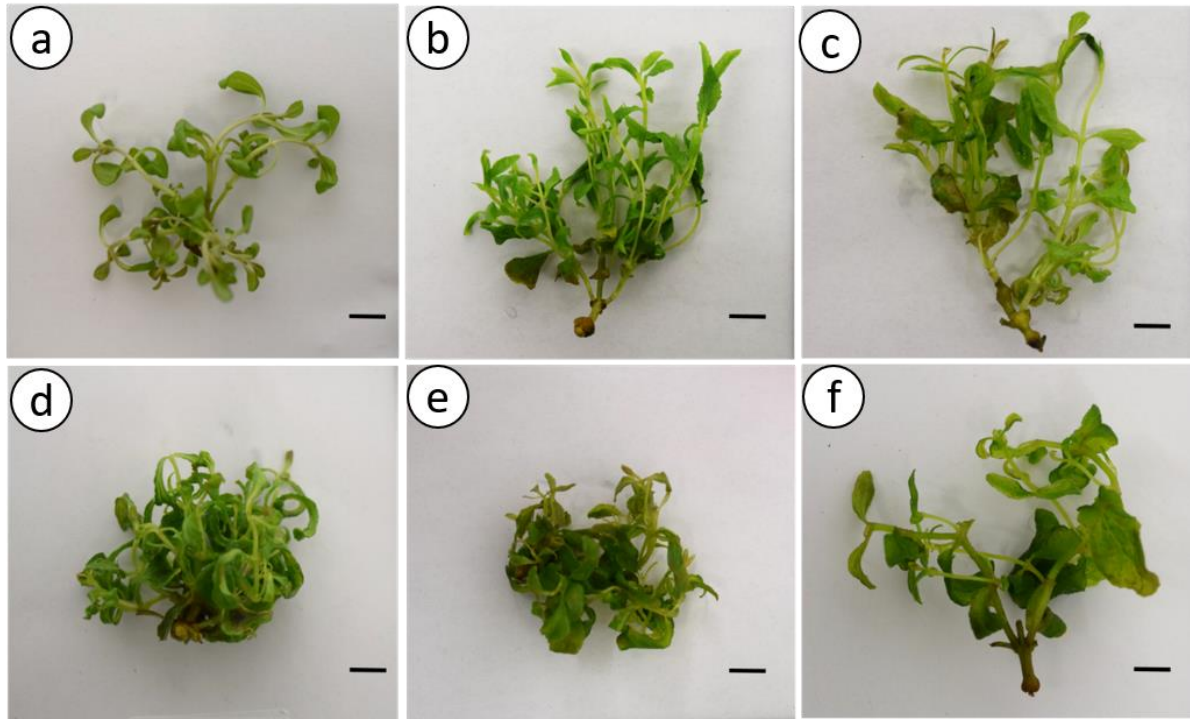


Figura 9. Brotes de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) después de 30 días de cultivo en Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT®). **(a-f)** 0, 12.5, 25, 50, 100 and 200 mg/L de Argovit, respectivamente. Barra = 1cm.

La adición de NPsAg en el medio de cultivo afectó significativamente la multiplicación y elongación de brotes. Las concentraciones más bajas de NPsAg promovieron una mayor producción y longitud de brotes por explante. Resultados similares fueron obtenidos por Razzaq *et al.* (2015) en plántulas de Trigo (*Triticum aestivum*) cv. NARC-2009 crecidas *in vitro* en medio MS con diferentes concentraciones, encontrando un mejor desarrollo en 25 mg/L de NPsAg. En vainilla (*Vanilla planifolia*), Spinoso-Castillo *et al.* (2017) utilizando NPsAg en recipientes de inmersión temporal automatizados (RITA®) observaron una mayor producción y longitud de brotes en una concentración de 50 mg/L de NPsAg. Recientemente, Bello-Bello *et al.* (2017) en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) utilizando el biorreactor de Inmersión Temporal (BIT®) reportaron un efecto hormético al utilizar NPsAg a bajas concentraciones, encontrando que concentraciones superiores a 50 mg/L ocasionan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). La activación de la respuesta antioxidante por exposición

de plantas a NPs metálicas ya ha sido utilizado para promover efectos positivos sobre la inducción de callos, regeneración de brotes y crecimiento *in vitro* (Kim *et al.* 2017). En arroz (*Oryza sativa* L.), Nair y Chung (2014) reportó un aumento en ROS en raíces de plántulas expuestas a NPsAg. De acuerdo a Poschenrieder *et al.* 2013, este efecto se debe a que las bajas concentraciones de metales pesados inducen efectos horméticos a través de la activación de los mecanismos de defensa del estrés de las plantas (Poschenrieder *et al.*, 2013). Por otro lado, Mattson, (2008) menciona que los metales tóxicos desencadenan directa o indirectamente la generación de ROS, actuando como señales que estimulan la activación de genes durante la detoxificación de ROS. En nuestro estudio, a partir de la dosis de 50 mg/L aumentó la materia seca, lo cual coincide con Najafi *et al.* (2014), quienes señalan que NPsAg a 25 y 50 mg/L tienen la capacidad de aumentar significativamente la altura de la planta, el peso fresco y seco en trigo.

Mediciones del contenido de Plata. La bioacumulación de Ag⁺ ha sido previamente estudiada en sistemas vegetales. Larue *et al.* (2014) expusieron plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) a 100 mg/L de NPsAg y encontraron que las hojas presentaban 18.93 µg/g dw de Ag⁺. El-Batal *et al.* (2016) aplicaron NPsAg mediante un spray foliar en dos variedades de frijol obteniendo que al adicionar 60 mg/L de NPsAg encontraron 0.35 y 0.49 µg/g dw de Ag⁺ en plantas enteras de las variedades Bronco y Nebraska, respectivamente, en comparación con 0.25, 0.29 µg/g dw de peso seco en los controles. En nuestras plantas control de estevia, se encontró una menor cantidad de Ag⁺ contenida en el tejido seco con 0.13 µg/g dw. Geisler-Lee *et al.* (2014) analizaron muestras de raíces y brotes de *Arabidopsis thaliana*, con aplicación foliar de 75 y 300 mg/L de NPsAg, quienes encontraron que las raíces acumularon 10 veces más Ag⁺ que los brotes. En nuestro estudio, las concentraciones de Ag⁺ más elevadas en tejido foliar (95.23 y 188.16 µg/g dw) fueron encontradas a altas concentraciones de NPsAg (100 y 200 mg/L de NPsAg). Sin embargo, no fue posible analizar muestras de raíz, lo que cual abre posibilidades de estudiar los niveles de acumulación de Ag en plantas completas de estevia, e incluso continuar evaluando en condiciones *ex vitro* la acumulación de Ag en tejidos de estevia. Los resultados obtenidos en esta

investigación sobre la bioacumulación de Ag en tejidos de estevia *in vitro* siguieren análisis futuros sobre genotoxicidad, estudios de cariotipos y presencia de micronúcleos.

6.3 Efecto de nanopartículas de Plata en el contenido de clorofila

Los contenidos de clorofila a, b y total mostraron diferencias significativas entre las concentraciones de NPsAg evaluadas (Fig. 10). De manera general, se observó un incremento en el contenido de clorofilas a partir de 50 mg/L. Los contenidos de clorofila a, b y total fueron menores en el tratamiento control y en la concentración más baja de NPsAg evaluada (12.5 mg/L).

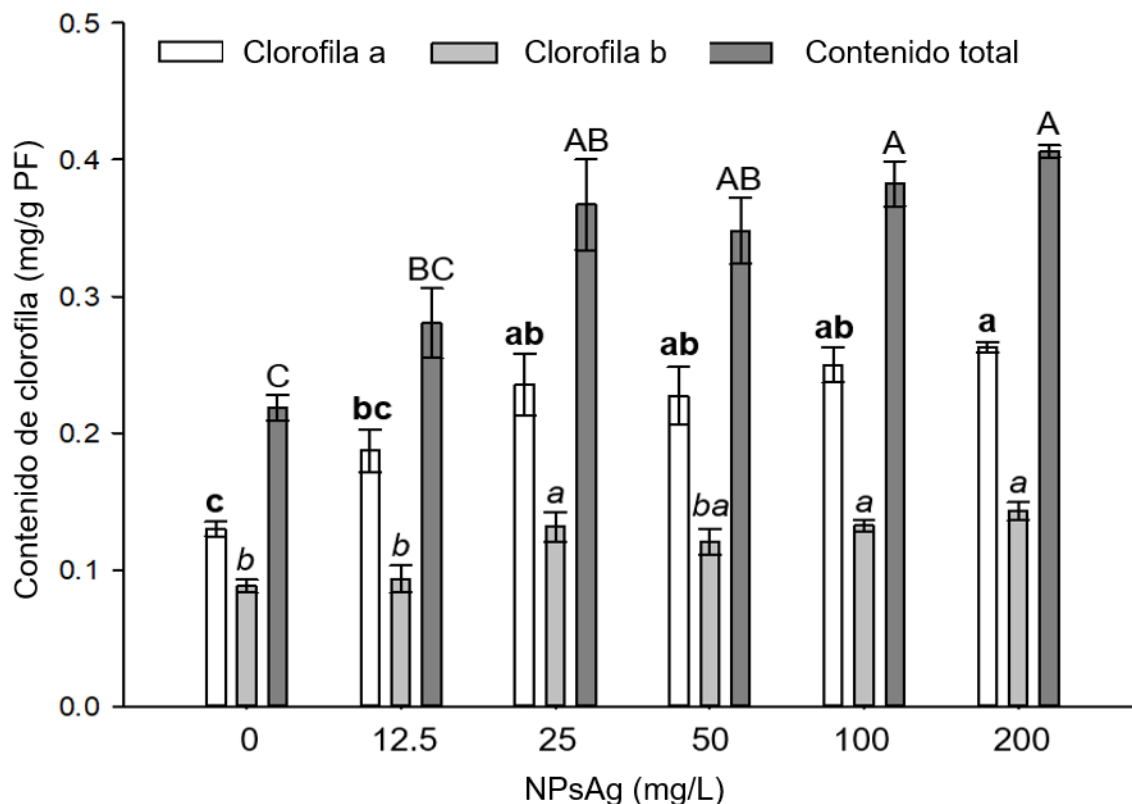


Figura 10. Contenido de clorofila después de la exposición de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) a diferentes concentraciones de Argovit. Media \pm error estándar dentro de una barra seguida de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey en ($P \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos sobre los contenidos de clorofila coinciden con los reportados por Razzaq *et al.* (2015), quien en trigo crecido *in vitro* la clorofila total aumentó significativamente en las concentraciones de 25, 50 y 100 mg/L de NPsAg. Por otro lado, Salama *et al.* (2012) en frijol (*Phaseolus vulgaris*) y maíz (*Zea mays*), la aplicación de 60 mg/L NPsAg incremento el contenido de clorofila. Najafi *et al.* (2014), en frijol chino (*Vigna radiata*) observaron un incremento en los contenidos de clorofila concentraciones de 50 mg/L de NPsAg. Nair y Chung (2014) demostraron que la exposición de arroz (*Oryza sativa*) a 0.5 mg/L de NPsAg, no solo disminuye significativamente la biomasa de raíces y brotes, si no también aumenta el contenido de clorofila y carotenoides. Recientemente, Spinoso-Castillo *et al.* (2017) y Bello-Bello

et al. (2017) reportaron un aumento en el contenido de pigmentos fotosintéticos en brotes de vainilla y caña expuestas a 50 mg/L NPsAg, este efecto probablemente se debió al aumento en las concentraciones N, Mg y Fe, ya que estos elementos están asociados a la biosíntesis de clorofila. El N es esencial en moléculas como clorofila, proteínas y ácidos nucleicos, en tanto que el Mg es necesario para las reacciones que involucran trifosfato de adenosina y se encuentra en el resto de porfirina de la molécula de clorofila, mientras que el Fe es importante en el grupo catalítico para las enzimas redox (Hopkins y Huner, 2004). Rico *et al.* (2015) reportan que el uso de NPs en plantas alteran la fluorescencia fotoquímica, la eficiencia fotosintética y el rendimiento cuántico. Gracias a esto, el conocimiento sobre las interacciones de las NPsAg con la maquinaria fotosintética proporciona conocimiento sobre el estrés oxidativo inducido por NPsAg y el sistema de defensa antioxidante en plantas. Por lo tanto, es posible que los resultados en nuestro estudio demuestren que los mecanismos de defensa de las plantas de estevia se vieron activados al adicionar bajas concentraciones de NPsAg.

6.4 Acumulación de NPsAg en tallos

Detección de plata en tallos y hojas de estevia mediante microscopia multifotón.

El análisis por microscopía multifotón permitió observar la presencia de las NPsAg en células epidérmicas de tallo, hojas y tallos de estevia. Los resultados demuestran la presencia de NPsAg en células epidérmicas del corte transversal del tallo en los diferentes tratamientos (Fig.11 b y c). Sin embargo, conforme se incrementa la concentración de NPsAg, estas se observan con mayor frecuencia en los espacios intercelulares de las células epidérmicas (Fig.11 d y e). La secuencia de imágenes de la Fig. 11 muestra el campo claro y la fluorescencia de las NPsAg y la progresión de la fluorescencia en la el corte transversal del tallo en diferentes tratamientos con NPsAg.

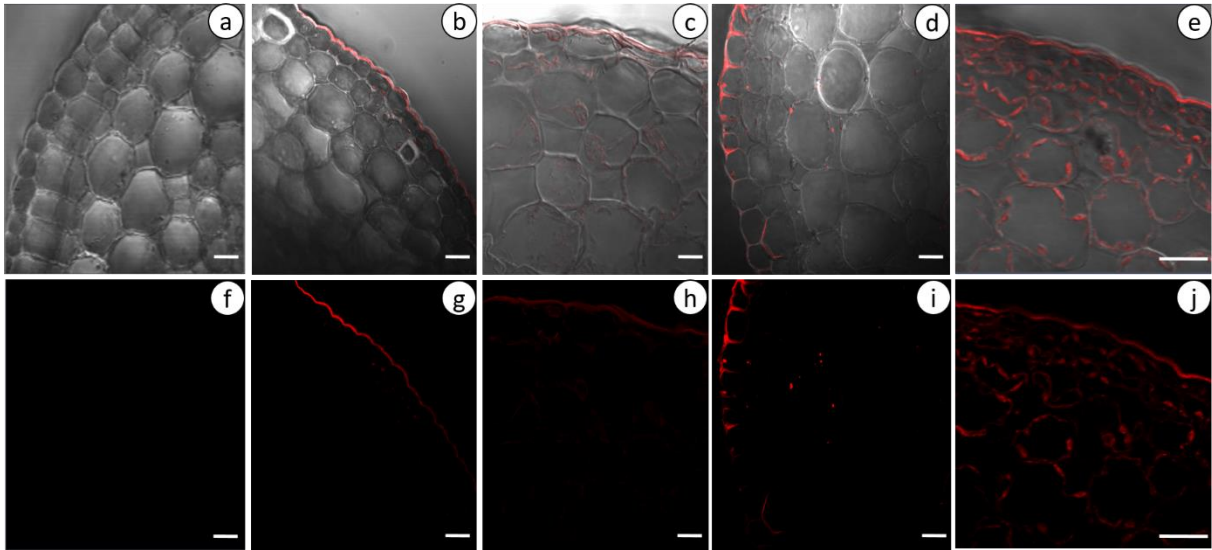


Figura 11. Identificación de fluorescencia en áreas específicas de la epidermis del tallo (imagen de campo claro y fluorescencia). **(a-e)** Imagen de campo claro y **(f-j)** Imagen de fluorescencia. De izquierda a derecha (0, 25, 50, 100 and 200 mg/L). Barra = 20 μ m.

Resulta difícil comparar los estudios e interpretar algunos de los trabajos realizados *in vitro* ya que cada estudio involucra NPs de diferentes tamaños, formas, y tipos de recubrimientos superficiales. Aunque es posible encontrar en mayor medida estudios de localización de NPsAg en raíces (Geisler, *et al.*, 2013; Mazumdar, 2014;), en este estudio nos enfocamos en localizar NPsAg en tejidos de tallo y hoja de estevia *in vitro* utilizando técnicas de microscopía multifotón. La técnica de aclarado desarrollada para este trabajo permitió extraer la clorofila presente en tejidos foliares y pigmentos asociados a las células epidérmicas del tallo, permitiendo eliminar la autofluorescencia y permitiendo recuperar la señal proveniente de la excitación de las NPsAg.

En células de tallo, de xilema y floema del tratamiento control no se observó fluorescencia (Fig. 12a). Sin embargo, en los tallos de estevia tratados con NPsAg fue posible observar fluorescencia dentro de haces vasculares y en células cercanas (Fig. 12b). Se observó fluorescencia emitida por NPsAg alrededor de las células del parénquima cortical, teniendo gran afinidad por los espacios intercelulares (Fig. 12c). En el caso de hojas, en el tratamiento testigo sin NPsAg no se observó fluorescencia

emitida por las NPsAg (Fig. 12d), mientras que en hojas tratadas con NPsAg se encontró fluorescencia en células epidérmicas de hoja y estomas (Fig. 12e). Finalmente, el escaneo de la superficie completa de la hoja tratada con NPsAg muestra una posible internalización en tejidos foliar a medida que incrementan las concentraciones de NPsAg. Además, se observó la propagación de la señal de fluorescencia de la vena media hacia los tejidos del mesófilo y parénquima (Fig. 12f).

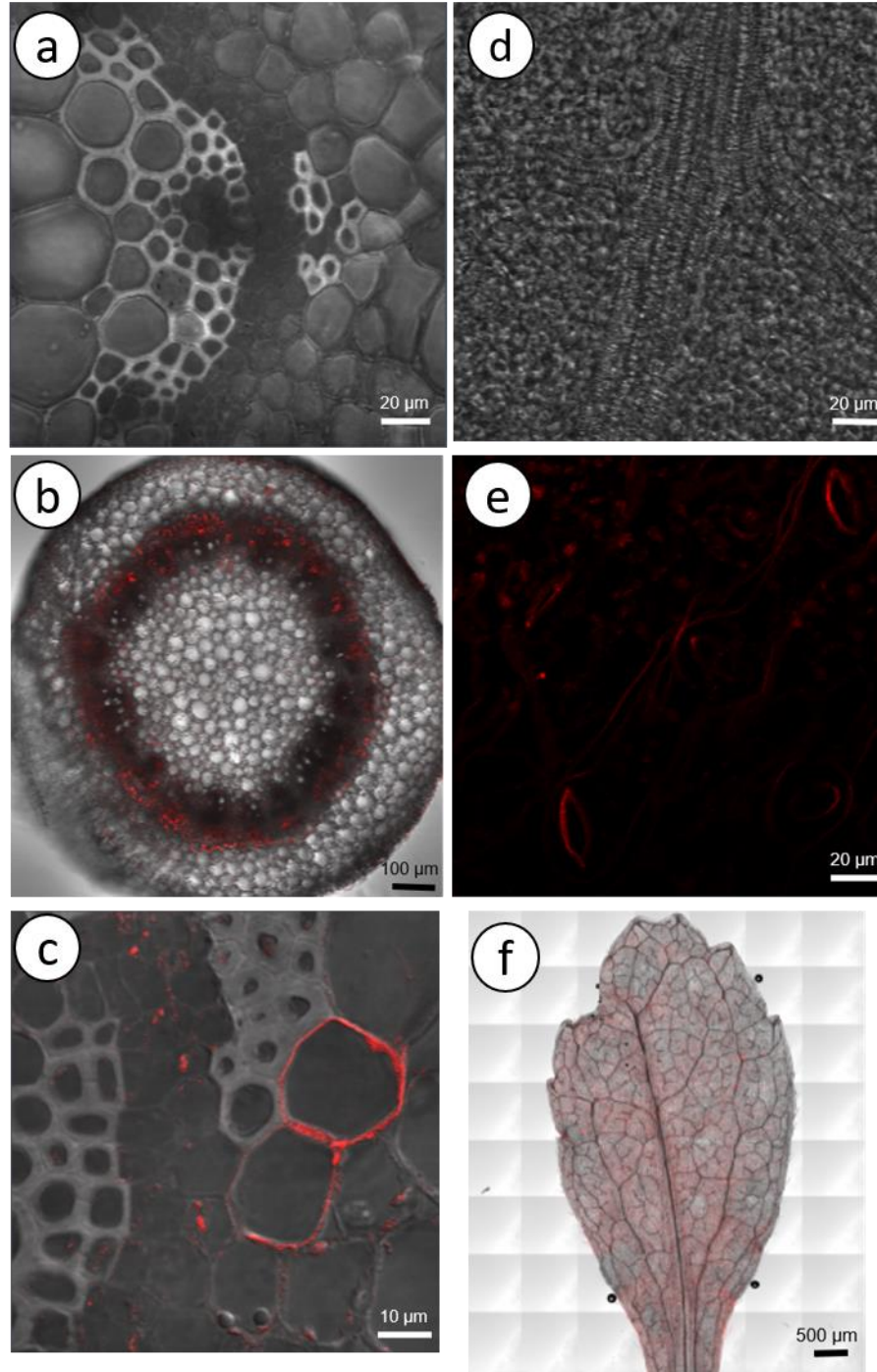


Figura 12. Identificación de fluorescencia por microscopio multifotón en puntos específicos en tallos y hojas de estevia. **(a)** venas vasculares del tratamiento control, **(b)** escaneo de la sección transversal de tallo, **(c)** presencia de plata en células **(d)** nervaduras de hoja control, **(e)** fluorescencia en estomas y **(f)** fluorescencia en hojas.

La microscopía de fluorescencia se ha utilizado como una herramienta en el estudio del mecanismo de internalización de nanomateriales en plantas (Liu *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2012). Esta misma herramienta se ha utilizado para localizar NPsAg en tejidos vegetales de *Arabidopsis thaliana* crecida *in vitro* (Geisler *et al.*, 2014) y en hojas de lechuga (Larue *et al.*, 2013). En las imágenes obtenidas como evidencia en este estudio, fue posible observar que el tejido expuesto a diferentes dosis de NPsAg presenta mayor fluorescencia inducida en la epidermis y respalda los resultados mencionados anteriormente. Además, se muestra que la cantidad de fluorescencia aumenta proporcionalmente a la concentración utilizada en nuestros tratamientos. De acuerdo a Medina-Velo *et al.* (2017) los nanomateriales pueden ser transportados desde la raíz, través de los espacios extracelulares de las células vía apoplástica hasta la endodermis o sistema vascular, siendo a través del xilema, la vía más importante en la distribución y translocación de NPs. Sin embargo, para cruzar la membrana celular, las NPs se transportan a través de los poros, lo cual indica que la captación de los nanomateriales es limitada por el tamaño de las nanopartículas (Rico *et al.*, 2011).

En nuestro estudio, fue posible observar pequeños puntos de fluorescencia en el interior de las células, probablemente este hecho se debe a que NPs de menor tamaño atraviesan de los poros de la membrana, considerando que, de acuerdo a Chesson *et al.* (1997), los poros de las membranas celulares oscilan entre los 3.5-5.5 nm. Sin embargo, los nanomateriales también pueden transportarse a través de los plasmodesmos, canales de aproximadamente 40 nm de diámetro que conectan las células adyacentes (Tilney *et al.*, 1991). De acuerdo a nuestra caracterización, al tamaño de las NPs de Argovit es de 35 ± 15 nm, lo cual indica que nuestras NPs tienen las características para ser transportada mediante los plasmodesmos. Existen diversos reportes que han explorado los mecanismos de transporte y acumulación de NPs en tejidos vegetales. Por otro lado, Buick *et al.* (1993), mencionan que las sales de tamaño nanométrico pueden ingresar en tejido foliar mediante dos mecanismos: el primer mecanismo es vía cuticular y el segundo vía estomas. Sin embargo, en su mayoría, los estudios que caracterizan el transporte de NPsAg han sido basados en

sistemas hidropónicos siendo escasos los estudios en plantas *in vitro*. Laurue *et al.* (2014), encontraron Ag aglomerada en la superficie de las hojas, mesofilo, epidermis, haces vasculares y en estomas. Lo anterior coincide con lo observado en hojas de estevia, demostrando que la fluorescencia emitida por las NPsAg permitió su visibilidad en superficies de hojas y estomas bajo condiciones *in vitro*.

7. CONCLUSIONES

La administración de NPsAg (Argovit) en explantes de estevia establecidos *in vitro* afecta el desarrollo y el contenido de clorofila. El efecto horméticos de las NPsAg en estevia, se encontró en la exposición a bajas concentraciones de NPsAg ya que estimula el crecimiento mientras que el incremento de la concentración de NPs produce la inhibición del desarrollo. El contenido de Ag retenida en brotes de estevia depende de las concentraciones adicionadas de Argovit al medio de cultivo. El uso de altas dosis de NPsAg son mayormente bioacumuladas en células y tejidos de estevia. La microscopía multifotón permitió establecer estos patrones de acumulación a través de una vía de internalización que pasa a través de los haces vasculares y se translocan a células vecinas vía apoplástica formando un gradiente de agregados de partículas que en su mayor parte se depositan entre los espacios intercelulares y llegan hasta hojas en donde se pueden depositar en estomas, probablemente siguiendo el flujo de agua y nutrientes que se difunden a través de la comunicación celular. El uso de NPsAg ha demostrado tener efecto positivo en la producción y longitud de brotes, como agente microbicida, cómo inhibidor en la síntesis de etileno, en la síntesis de pigmentos fotosintéticos, acumulación de nutrientes, metabolismo de antioxidantes y generación de ROS. Nuestro estudio aporta conocimiento para continuar comprendiendo los efectos y mecanismos de transporte, localización y translocación de NPs aplicadas al cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Además, nuestros resultados abren la posibilidad de aplicar Argovit para evaluar el potencial de su uso en cultivos *in vitro* de interés agrícola.

8. LITERATURA CITADA

- Alarcon, E. I., Udekwu, K., Skog, M., Pacioni, N. L., Stampleskoskie, K. G., González-Béjar, M., ... & Scaiano, J. C. (2012). The biocompatibility and antibacterial properties of collagen-stabilized, photochemically prepared silver nanoparticles. *Biomaterials*, 33(19), 4947-4956.
- Alcántar-González, G., & Sandoval-Villa, M. (1999). Manual de análisis químico de tejido vegetal. *Publicación especial*, 10.
- Arab, M. M., Yadollahi, A., Hosseini-Mazinani, M., & Bagheri, S. (2014). Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on *in vitro* establishment of Gx N15 (hybrid of almondx peach) rootstock. *Journal of genetic engineering and biotechnology*, 12(2), 103-110.
- Aslani, F., Bagheri, S., Muhd Julkapli, N., Juraimi, A. S., Hashemi, F. S. G., & Baghdadi, A. (2014). Effects of engineered nanomaterials on plants growth: an overview. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Barriocanal, L. A., Palacios, M., Benitez, G., Benitez, S., Jimenez, J. T., Jimenez, N., & Rojas, V. (2008). Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 51(1), 37-41.
- Bello-Bello, J. J., Chavez-Santoscoy, R. A., Lecona-Guzman, C. A., Bogdanchikova, N., Salinas-Ruíz, J., Gomez-Merino, F. C., & Pestryakov, A. (2017). Hormetic Response by Silver Nanoparticles on *In Vitro* Multiplication of Sugarcane (*Saccharum* spp. Cv. Mex 69-290) Using a Temporary Immersion System. *Dose-Response*, 15(4), 1559325817744945.
- Berthouly, M., & Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In *Liquid culture systems for in vitro plant propagation* (pp. 165-195). Springer, Dordrecht.
- Bouwman, A. M., Bosma, J. C., Vonk, P., Wesselingh, J. H. A., & Frijlink, H. W. (2004). Which shape factor (s) best describe granules?. *Powder Technology*, 146(1-2), 66-72.

- Brandle, J. E., & Telmer, P. G. (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68(14), 1855-1863.
- Bridgen, M. P., Van Houtven, W., & Eeckhaut, T. (2018). Plant Tissue Culture Techniques for Breeding. In *Ornamental Crops* (pp. 127-144). Springer, Cham.
- Buick, R. D., Buchan, G. D., & Field, R. J. (1993). The role of surface tension of spreading droplets in absorption of an herbicide formulation via leaf stomata. *Pesticide science*, 38(2-3), 227-235.
- Butt, S. J., Varis, S., Nasir, I. A., Sheraz, S., & Shahid, A. (2015). Micro propagation in advanced vegetable production: a review. *Advancements in Life Sciences*, 2(2), 48-57.
- Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K. L., Jones, R. L., & Schlager, J. J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The journal of physical chemistry B*, 112(43), 13608-13619.
- Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., ... & Golland, P. (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome biology*, 7(10), R100.
- Chatsudthipong, V., & Muanprasat, C. (2009). Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & therapeutics*, 121(1), 41-54.
- Cherian, C., & Arnepalli, D. N. (2016). Material characterisation by digital image analysis: a review. *Environmental Geotechnics*, 1-1.
- Chesson, A., Gardner, P. T., & Wood, T. J. (1997). Cell wall porosity and available surface area of wheat straw and wheat grain fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(3), 289-295.
- Chopra, I. (2007). The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(4), 587-590.
- Cvjetko, P., Milošić, A., Domijan, A. M., Vrčec, I. V., Tolić, S., Štefanić, P. P., ... & Balen, B. (2017). Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and environmental safety*, 137, 18-28.

- Dudkiewicz, A., Tiede, K., Loeschner, K., Jensen, L. H. S., Jensen, E., Wierzbicki, R., ... & Molhave, K. (2011). Characterization of nanomaterials in food by electron microscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(1), 28-43.
- El-Batal, A. I., Gharib, F. A. E. L., Ghazi, S. M., Hegazi, A. Z., & Hafz, A. G. M. A. E. (2016). Physiological responses of two varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to foliar application of silver nanoparticles. *Nanomaterials and Nanotechnology*, 6, 13.
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., & Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18(9), 743-748.
- Feng, L., Zhang, Y., Xi, J., Zhu, Y., Wang, N., Xia, F., & Jiang, L. (2008). Petal effect: a superhydrophobic state with high adhesive force. *Langmuir*, 24(8), 4114-4119.
- Geisler-Lee, J., Brooks, M., Gerfen, J. R., Wang, Q., Fotis, C., Sparer, A., ... & Geisler, M. (2014). Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana*. *Nanomaterials*, 4(2), 301-318.
- Geisler-Lee, J., Wang, Q., Yao, Y., Zhang, W., Geisler, M., Li, K., ... & Ma, X. (2012). Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology*, 7(3), 323-337.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in life sciences*, 14(6), 607-621.
- Gliga, A. R., Skoglund, S., Wallinder, I. O., Fadeel, B., & Karlsson, H. L. (2014). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and fibre toxicology*, 11(1), 11.
- Gordon, A., Colman-Lerner, A., Chin, T. E., Benjamin, K. R., Richard, C. Y., & Brent, R. (2007). Single-cell quantification of molecules and rates using open-source microscope-based cytometry. *Nature methods*, 4(2), 175.
- Gorka, D. E., Osterberg, J. S., Gwin, C. A., Colman, B. P., Meyer, J. N., Bernhardt, E. S., ... & Liu, J. (2015). Reducing environmental toxicity of silver nanoparticles through shape control. *Environmental science & technology*, 49(16), 10093-10098
- Grigorova, B., Vassileva, V., Klimchuk, D., Vaseva, I., Demirevska, K., & Feller, U. (2012). Drought, high temperature, and their combination affect ultrastructure of

- chloroplasts and mitochondria in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Journal of Plant Interactions*, 7(3), 204-213.
- Grigороva, B., Vassileva, V., Klimchuk, D., Vaseva, I., Demirevska, K., & Feller, U. (2012). Drought, high temperature, and their combination affect ultrastructure of chloroplasts and mitochondria in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Journal of Plant Interactions*, 7(3), 204-213.
- Guada, C., Gómez, D., Rodríguez, J. T., Yáñez, J., & Montero, J. (2016). Classifying image analysis techniques from their output. *International Journal of Computational Intelligence Systems*, 9(sup1), 43-68.
- Gupta, E., Purwar, S., Sundaram, S., & Rai, G. K. (2013). Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(46), 3343-3353.
- Handy, R. D., Von der Kammer, F., Lead, J. R., Hassellöv, M., Owen, R., & Crane, M. (2008). The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17(4), 287-314.
- Harborne, J. B. (1984). Phenolic compounds. In *Phytochemical methods* (pp. 37-99). Springer, Dordrecht.
- He, J., Du, Y., Villa-Urbe, J. L., Hwang, C., Li, D., & Khademhosseini, A. (2010). Rapid generation of biologically relevant hydrogels containing long-range chemical gradients. *Advanced functional materials*, 20(1), 131-137.
- Holdren, J. P. (2011). Materials genome initiative for global competitiveness. *National Science and technology council OSTP. Washington, USA*.
- Hopkins, W. G., & Hüner, N. (2004). *Introduction to plant physiology* (No. 581.1 H6 2004).
- Hussain, M., Raja, N. I., Naz, F., Iqbal, M., & Aslam, S. (2018). Green synthesis and characterisation of silver nanoparticles and their effects on antimicrobial efficacy and biochemical profiling in *Citrus reticulata*. *IET nanobiotechnology*, 12(4), 514-519.
- Iavicoli, I., Fontana, L., Corbi, M., Leso, V., Marinaccio, A., Leopold, K., ... & Sgambato, A. (2015). Exposure to palladium nanoparticles affects serum levels of cytokines in female wistar rats. *PloS one*, 10(11), e0143801.

- Iriondo Alegría, J. M. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg (ES)*, 16(1), 5-24.
- Jagatheeswari, D., & Ranganathan, P. (2012). Studies on micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. *Inter. J. Pharm. Biol. Arch*, 3(2012), 315-320.
- Jain P, Kachhwaha S, Kothari SL. Improved micro propagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* Bertoni by using high copper levels in the culture medium. *Sci Hortic*. 2009;119: 315–319.
- Jericó, J. J., Bello-Bello, J. J., Spinoso-Castillo, J., & Iglesias-Andreu, L. G. (2014). Establecimiento de un sistema de biorreactores para la micropropagación de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *AGRO*.
- Jhanzab, H. M., Razzaq, A., Jilani, G., Rehman, A., Hafeez, A., & Yasmeen, F. (2015). Silver nano-particles enhance the growth, yield and nutrient use efficiency of wheat. *Int J Agron Agri Res*, 7(1), 15-22.
- Jin, R., Cao, Y., Mirkin, C. A., Kelly, K. L., Schatz, G. C., & Zheng, J. G. (2001). Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. *science*, 294(5548), 1901-1903.
- Juárez-Maldonado, A., Rosales-Velázquez, J. L., Ortega-Ortiz, H., Cabrera-De-la-Fuente, M., Ramírez, H., & Benavides-Mendoza, A. (2013). Accumulation of silver nanoparticles and its effect on the antioxidant capacity in *Allium cepa* L. *Phyton (Buenos Aires)*, 82, 91-97.
- Juarez-Moreno, K., Gonzalez, E. B., Girón-Vazquez, N., Chávez-Santoscoy, R. A., Mota-Morales, J. D., Perez-Mozqueda, L. L., ... & Bogdanchikova, N. (2017). Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Human & experimental toxicology*, 36(9), 931-948.
- Kaegi, R., Voegelin, A., Ort, C., Sinnet, B., Thalmann, B., Krismer, J., ... & Mueller, E. (2013). Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems. *Water research*, 47(12), 3866-3877.
- Karim, Z., Uesugi, D., Nakayama, N., Hossain, M. M., Ishihara, K., & Hamada, H. (2015). Identification of Stevioside Using Tissue Culture-Derived *Stevia (Stevia rebaudiana)* Leaves. *Biochemistry insights*, 8, BCI-S30378.

- Keller, A. A., McFerran, S., Lazareva, A., & Suh, S. (2013). Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(6), 1692.
- Kim, D. H., Gopal, J., & Sivanesan, I. (2017). Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. *RSC Advances*, 7(58), 36492-36505.
- Kokura, S., Handa, O., Takagi, T., Ishikawa, T., Naito, Y., & Yoshikawa, T. (2010). Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(4), 570-574.
- Koubaa, M., Roselló-Soto, E., Šic Žlabur, J., Režek Jambrak, A., Brnčić, M., Grimi, N., Boussetta, N., & Barba, F. J. (2015). Current and new insights in the sustainable and green recovery of nutritionally valuable compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(31), 6835-6846.
- Kovačević, D. B., Maras, M., Barba, F. J., Granato, D., Roohinejad, S., Mallikarjunan, K., ... & Putnik, P. (2018). Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: A review. *Food Chemistry*.
- Larue, C., Castillo-Michel, H., Sobanska, S., Cécillon, L., Bureau, S., Barthès, V., ... & Sarret, G. (2014). Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: evidence for internalization and changes in Ag speciation. *Journal of hazardous materials*, 264, 98-106.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., & Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food chemistry*, 132(3), 1121-1132.
- Li, W., Lee, S. S., Wu, J., Hinton, C. H., & Fortner, J. D. (2016). Shape and size controlled synthesis of uniform iron oxide nanocrystals through new non-hydrolytic routes. *Nanotechnology*, 27(32), 324002.
- Lin, D., & Xing, B. (2008). Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental science & technology*, 42(15), 5580-5585.
- Liu, J., He, S., Zhang, Z., Cao, J., Lv, P., He, S., *et al.* (2009). Nano-silver pulse treatments inhibit stem-end bacteria on cut gerbera cv. Ruikou flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 54, 59–62.

- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., & Kolmakov, A. (2010). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the total environment*, 408(16), 3053-3061.
- Madan, S., Ahmad, S., Singh, G. N., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R., & Garg, M. (2010). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni-a review.
- Mahna, N., Vahed, S. Z., & Khani, S. (2013). Plant in vitro culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of ex vitro explants. *J Nanomed Nanotechol*, 4(161), 1.
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing research reviews*, 7(1), 1-7.
- Mazumdar, H. (2014). Toxicological effects of silver nanoparticles in selected cop plants. *Int J Chem Environ*, 101-106.
- Medina-Velo, I. A., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2017). Assessing plant uptake and transport mechanisms of engineered nanomaterials from soil. *MRS Bulletin*, 42(5), 379-384.
- Megason, S. G., & Fraser, S. E. (2007). Imaging in systems biology. *Cell*, 130(5), 784-795.
- Mehrotra, S., Goel, M. K., Kukreja, A. K., & Mishra, B. N. (2007). Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology*, 6(13).
- Monica, R. C., & Cremonini, R. (2009). Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 62(2), 161-165. Monica, R. C., & Cremonini, R. (2009). Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 62(2), 161-165.
- Mousavi, S. R., & Rezaei, M. (2011). Nanotechnology in agriculture and food production. *J Appl Environ Biol Sci*, 1(10), 414-419. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth y bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nair, P. M. G., & Chung, I. M. (2014). Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, 112, 105-113.
- Panzarini, E., Mariano, S., Carata, E., Mura, F., Rossi, M., & Dini, L. (2018). Intracellular Transport of Silver and Gold Nanoparticles and Biological Responses: An Update. *International journal of molecular sciences*, 19(5).

- Parveen, A., & Rao, S. (2015). Effect of nanosilver on seed germination and seedling growth in *Pennisetum glaucum*. *Journal of Cluster Science*, 26(3), 693-701.
- Patel, P., Agarwal, P., Kanawaria, S., Kachhwaha, S., & Kothari, S. L. (2015). Plant-based synthesis of silver nanoparticles and their characterization. In *Nanotechnology and Plant Sciences* (pp. 271-288). Springer, Cham.
- Patlolla, A. K., Berry, A., May, L., & Tchounwou, P. B. (2012). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia faba*: a pilot study on the environmental monitoring of nanoparticles. *International journal of environmental research and public health*, 9(5), 1649-1662.
- Peralta-Videa, J. R., Zhao, L., Lopez-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hong, J., & Gardea-Torresdey, J. L. (2011). Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008–2010. *Journal of hazardous materials*, 186(1), 1-15.
- Pokhrel, L. R., Silva, T., Dubey, B., El Badawy, A. M., Tolaymat, T. M., & Scheuerman, P. R. (2012). Rapid screening of aquatic toxicity of several metal-based nanoparticles using the MetPLATE™ bioassay. *Science of the Total Environment*, 426, 414-422.
- Poschenrieder, C., Cabot, C., Martos, S., Gallego, B., & Barceló, J. (2013). Do toxic ions induce hormesis in plants?. *Plant science*, 212, 15-25.
- Pradas del Real, A. E., Vidal, V., Carrière, M., Castillo-Michel, H., Levard, C., Chaurand, P., & Sarret, G. (2017). Silver nanoparticles and wheat roots: a complex interplay. *Environmental science & technology*, 51(10), 5774-5782.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2016). Direct organogenesis of *Stevia rebaudiana* Bertoni using thin cell layer (TCL) method. *Sugar Tech*, 18(4), 424-428.
- Razzaq, A., Ammara, R., Jhanzab, H. M., Mahmood, T., Hafeez, A., & Hussain, S. (2015). A novel nanomaterial to enhance growth and yield of wheat. *Journal of Nanoscience and Technology*, 55-58.
- Rejeski, D. (2009). Nanotechnology and consumer products. *CPSC FY2010 Agenda and Priorities, Testimony before the Consumer Products Safety Commission*.
- Rico, C. M., Barrios, A. C., Tan, W., Rubenecia, R., Lee, S. C., Varela-Ramirez, A., ... & Gardea-Torresdey, J. L. (2015). Physiological and biochemical response of soil-

- grown barley (*Hordeum vulgare* L.) to cerium oxide nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10551-10558.
- Rongchao, J. I. A. N. G. (2001). Some Practical Means for improving Diamond Tool Quality [J]. *Diamond & Abrasives Engineering*, 4, 004.
- Ruttikay-Nedecky, B., Krystofova, O., Nejdil, L., & Adam, V. (2017). Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity. *Journal of nanobiotechnology*, 15(1), 33.
- Saeideh, N., & Rashid, J. (2014). Effect of silver nanoparticles and Pb (NO 3) 2 on the yield and chemical composition of mung bean (*Vigna radiata*). *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 10(1).
- Saha, N., & Gupta, S. D. (2018). Promotion of shoot regeneration of *Swertia chirata* by biosynthesized silver nanoparticles and their involvement in ethylene interceptions and activation of antioxidant activity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-12.
- Salama, H. M. (2012). Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *Int Res J Biotechnol*, 3(10), 190-197.
- Sharon, M., Choudhary, A. K., & Kumar, R. (2010). Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. *Journal of Phytology*, 2(4).
- Shen, Z., Jin, F., Wang, F., McMillan, O., & Al-Tabbaa, A. (2015). Sorption of lead by Salisbury biochar produced from British broadleaf hardwood. *Bioresource technology*, 193, 553-556.
- Singh, M., Singh, S., Prasad, S., & Gambhir, I. S. (2008). Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3(3), 115-122.
- Sivanesan, I., & Jeong, B. R. (2014). Silicon promotes adventitious shoot regeneration and enhances salinity tolerance of *Ajuga multiflora* Bunge by altering activity of antioxidant enzyme. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Solgi, M., Kafi, M., Taghavi, T. S., & Naderi, R. (2009). Essential oils and silver nanoparticles (SNP) as novel agents to extend vase-life of gerbera (*Gerbera jamesonii* cv. 'Dune') flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 53(3), 155-158.

- Spinoso-Castillo, J. L., Chavez-Santoscoy, R. A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J. A., Morales-Ramos, V., & Bello-Bello, J. J. (2017). Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 129(2), 195-207.
- Stampoulis, D., Sinha, S. K., & White, J. C. (2009). Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental science & technology*, 43(24), 9473-9479.
- Takayama, S., & Akita, M. (2008). Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. In *Plant Tissue Culture Engineering* (pp. 83-100). Springer, Dordrecht. pp 83–10
- Tiede, K., Boxall, A. B., Tear, S. P., Lewis, J., David, H., & Hassellöv, M. (2008). Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Additives and Contaminants*, 25(7), 795-821.
- Tighe, M., Lockwood, P., Wilson, S., & Lisle, L. (2004). Comparison of digestion methods for ICP-OES analysis of a wide range of analytes in heavy metal contaminated soil samples with specific reference to arsenic and antimony. *Communications in soil science and plant analysis*, 35(9-10), 1369-1385.
- Tilney, L. G., Cooke, T. J., Connelly, P. S., & Tilney, M. S. (1991). The structure of plasmodesmata as revealed by plasmolysis, detergent extraction, and protease digestion. *The Journal of cell biology*, 112(4), 739-747
- Toffler, F.; Orio, A., 1981. Acceni sulla piñata tropicale 'Kaa-he-e' ou dolce'. *Rev. Soc. It. Sci. Aliment.* 4:225-230.
- Wang, P., Lombi, E., Sun, S., Scheckel, K. G., Malysheva, A., McKenna, B. A., ... & Kopittke, P. M. (2017). Characterizing the uptake, accumulation and toxicity of silver sulfide nanoparticles in plants. *Environmental Science: Nano*, 4(2), 448-460.
- Wang, Q., Niemi, J., Tan, C. M., You, L., & West, M. (2010). Image segmentation and dynamic lineage analysis in single-cell fluorescence microscopy. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Advancement of Cytometry*, 77(1), 101-110.

- Wang, Z., Xie, X., Zhao, J., Liu, X., Feng, W., White, J. C., & Xing, B. (2012). Xylem-and phloem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.). *Environmental science & technology*, 46(8), 4434-4441.
- Wessels, D., Kuhl, S., & Soll, D. R. (2006). Application of 2D and 3D DIAS to motion analysis of live cells in transmission and confocal microscopy imaging. In *Dictyostelium discoideum Protocols* (pp. 261-279). Humana Press.
- Wild, E., & Jones, K. C. (2009). Novel method for the direct visualization of in vivo nanomaterials and chemical interactions in plants. *Environmental science & technology*, 43(14), 5290-5294.
- Y. Zhang, D. Yang, Y. Kong, X. Wang, O. Pandoli and G. Gao, *Nano. Biomed. Eng.*, 2, 252 (2010).
- Yin, L., Colman, B. P., McGill, B. M., Wright, J. P., & Bernhardt, E. S. (2012). Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. *PLoS One*, 7(10), e47674.
- Zhang, Q., Li, N., Goebel, J., Lu, Z., & Yin, Y. (2011). A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: is citrate a "magic" reagent?. *Journal of the American Chemical Society*, 133(46), 18931-18939.
- Zhang, Z., He, X., Zhang, H., Ma, Y., Zhang, P., Ding, Y., & Zhao, Y. (2011). Uptake and distribution of ceria nanoparticles in cucumber plants. *Metallomics*, 3(8), 816-822.
- Zhang, Z., Kong, F., Vardhanabhuti, B., Mustapha, A., & Lin, M. (2012). Detection of engineered silver nanoparticle contamination in pears. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(43), 10762-10767.
- Zhu, H., Han, J., Xiao, J. Q., & Jin, Y. (2008). Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental monitoring*, 10(6), 713-717.