



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

POSTGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

**UTILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LA
PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE VAINILLA (*Vanilla planifolia*)
UTILIZANDO UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL**

JOSE LUIS SPINOSO CASTILLO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

JULIO, 2016

**UTILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LA
PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE VAINILLA (*Vanilla planifolia*)
UTILIZANDO UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL**

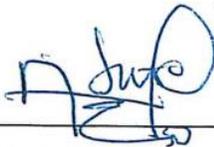
La presente tesis, titulada: **Utilización de nanopartículas de plata para la propagación *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia*) utilizando un Sistema de Inmersión Temporal**, realizada por el alumno: **José Luis Spinoso Castillo**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: _____



DR. JUAN ANTONIO PEREZ SATO

ASESOR: _____



DR. JERICO JABIN BELLO BELLO

ASESOR: _____



DR. JOSE HUMBERTO CAAMAL VELASQUEZ

ASESOR: _____



DR. VICTORINO MORALES RAMOS

Amatlán de Los Reyes, Veracruz, Julio de 2016

RESUMEN

Utilización de nanopartículas de plata para la propagación *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia*) utilizando un Sistema de Inmersión Temporal

José Luis Spinoso Castillo, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2016.

Las nanopartículas de plata (AgNPs) tienen un efecto microbicida sobre la contaminación en el cultivo de tejidos vegetales y pueden ser utilizadas para promover el desarrollo en plantas a bajas concentraciones (hormésis). La respuesta microbicida, hormética y cito-genotóxica de AgNPs sobre la regeneración *in vitro* de vainilla (*V. planifolia*) fue evaluada utilizando un sistema de inmersión temporal. Brotes regenerados *in vitro* fueron cultivados en medio de Murashige y Skoog (MS) suplementado con AgNPs a diferentes dosis (0, 25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹). El porcentaje de contaminación fue evaluado, la regeneración de brotes y longitud se utilizaron para determinar la respuesta hormética. Se determinó la acumulación de macro y micronutrientes. Además, el contenido total de compuestos fenólicos (TPC), Especies Reactivas a Oxígeno (ROS), Capacidad Antioxidante (ORAC) y Peroxidación Lipídica (LP-MDA) fue determinado. Los resultados mostraron que la contaminación bacteriana se erradicó en las dosis de 50, 100 y 200 mg L⁻¹ de AgNPs. Se observó un aumento significativo ($p \leq 0.05$) del crecimiento a los 25 y 50 mg L⁻¹ de AgNPs, mientras que la inhibición significativa se detectó a 100 y 200 mg L⁻¹ de AgNPs. Se observó una disminución dependiente de la dosis en el índice mitótico (88 a 33,5 %) y un aumento en el número de aberraciones cromosómicas. El análisis de nutrientes minerales reveló diferencias significativas en las concentraciones de macro y micronutrientes ejercidas por AgNPs. Los resultados sugieren que la producción de ROS y la nutrición mineral son mecanismos importantes de hormésis inducida por AgNPs en vainilla a 50 mg L⁻¹ de AgNPs en el medio de cultivo.

PALABRAS CLAVE: Micropropagación, Nanobiotecnología, Contaminación microbiana, Nanopartículas de plata.

ABSTRACT

Using silver nanoparticles for *in vitro* propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a Temporary Immersion System

José Luis Spinoso Castillo, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2016.

Silver nanoparticles (AgNPs) maintain a microbicidal effect in microbial contamination in plant tissue culture and can be used for improving development in plants at low concentrations (hormesis). The antimicrobial, hormetic and genotoxic responses by silver nanoparticles (AgNPs) on *in vitro* regeneration of vanilla (*V. planifolia*) were evaluated using a Temporary Immersion System. *In vitro* regenerated shoots were grown in Murashige and Skoog (MS) medium with AgNPs at different concentrations of 0, 25, 50, 100 and 200 mg L⁻¹. Contamination percentage was evaluated; shoot regeneration and length were used to determine the hormetic response. Analysis of macro and micronutrient contents was performed. In addition, Total Phenolic Content (TPC), Reactive Oxygen Species (ROS), Antioxidant Capacity (ORAC) and Lipid Peroxidation (LP-MDA) were determined. Results showed that bacterial contamination was reduced 50, 100 y 200 mg L⁻¹ of AgNPs. Significant increment ($p \leq 0.05$) on growth was observed at 25 and 50 mg L⁻¹ of AgNPs, while significant inhibition was detected at 100 y 200 mg L⁻¹ of AgNPs. We noted a dose-dependent decrease in the mitotic index (88 to 33.5 %) and an increase in the number of chromosomal aberrations. Mineral nutrient analysis revealed changes in macro and micronutrient concentrations exerted by AgNPs. Results suggested that the production of ROS and mineral nutrition are key mechanisms of AgNPs induced hormesis for vanilla at 50 mg L⁻¹ of AgNPs in the culture media.

KEY WORDS: Micropropagation, Nanobiotechnology, Microbial contamination, Silver nanoparticles.

AGRADECIMIENTOS

Acto que dedico:

A DIOS: Fuente inagotable de sabiduría.

A MIS PADRES: Miguel Ángel Spinoso Muñoz y Eloina Castillo Martínez, por darme la vida, sabios consejos, cariño y apoyo incondicional que me han mostrado siempre.

A MI HERMANA: Eloina, por su amistad, apoyo y cariño.

A MI NOVIA: Leo, por su amor, amistad, alegría, confianza y apoyo incondicional en este tiempo, a sus padres Mauro y Julia, por su apoyo, consejos y comprensión.

A MIS COMPAÑEROS DEL COLPOS: Eduardo, Michi, Judith, Miriam, Celia, Jimmy, Pepe, Sandra, por compartir experiencias y conocimientos a lo largo de este tiempo y por agregarle más alegría a mi vida, con mucho cariño.

A todos, gracias por ser parte esencial de mi vida.

Acto que agradezco:

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

A la Red Internancional de Bionanotecnología del CNyN-UNAM, en especial a la Dra. Nina Bogdanchikova por su apoyo económico y de vinculación entre instituciones.

A la Universidad Autónoma de Baja California-Campus Ensenada, en especial a al Dra. Evarista Arellano por recibirme en su laboratorio de toxicología y brindarme su apoyo y guía en la parte experimental, además por mostrarme la humildad y humanidad en la investigación.

Al Colegio de Posgraduados Campus Córdoba, por brindarme las instalaciones para realizar mi proyecto.

A la Universidad Veracruzana, Facultad de ciencias Biológicas y Agrícolas-Campus Córdoba, en especial al Médico Carlos Galán Paéz y a la M.C. Norma por recibirme en su laboratorio de microscopía y brindarme su apoyo en la parte experimental.

A mi director de tesis, Dr. Jericó Jabín Bello Bello, por la oportunidad, el apoyo y la confianza brindados durante todo este tiempo, por las palabras de ánimo. Por el inicio de nuevos desafíos, gracias.

A mi consejo, Dr. Juan Antonio Pérez Sato, Dr. Victorino Morales Ramos y Dr. Jose Humberto Caamal Velasquez, por la disposición y apoyo en esta trayectoria. Gracias a todos por sus consejos, sugerencias y entusiasmo al lograr concluir este ciclo.

A mis profesores de Maestría, Dra. Obdulia Bernal, Dra. Katia Figueroa, Dr. Hector Debernardi, Dra. Roselia Servin, Dr. Valente Hidalgo, gracias por compartir sus conocimientos.

CONTENIDO

RESUMEN	II
AGRADECIMIENTOS	IV
CONTENIDO	VI
LISTA DE CUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVO GENERAL	3
2.1 Objetivos particulares	3
III. HIPÓTESIS GENERAL	4
IV. MARCO TEÓRICO	5
4.1 Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)	5
4.2 Micropropagación.....	5
4.3 Micropropagación de <i>V. planifolia</i>	7
4.4 Sistemas de cultivo en medio líquido.....	8
4.5 Sistemas de Inmersión Temporal (SIT).....	10
4.6 Constitución básica de los biorreactores.....	11
4.7 El recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA [®])	12
4.8 Bionanotecnología: aplicación y uso de los nanomateriales.....	13
4.9 Nanopartículas de plata (AgNPs)	14
4.10 Aplicación de las AgNPs en el CTV	16
4.11 Cito-Genotoxicidad <i>in vitro</i> por exposición a AgNPs	18
4.12 Estrés oxidativo y generación de Especies Reactivas a Oxígenos (ROS) por exposición a AgNPs.....	20
4.13 Interacción de las AgNPs con Macro y Micronutrientes.....	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 Ubicación del experimento	27
5.2 Material vegetal	27
5.3 Características de las nanopartículas de plata (AgNPs).....	28
5.4 Lavado, desinfección y establecimiento de explantes	29

5.5	Preparación de medio MS para la fase de multiplicación con AgNPs en RITA®	29
5.6	Preparación del medio MS semisólido para la fase de elongación y enraizamiento con AgNPs	30
5.7	Condiciones de incubación.....	30
5.8	Determinación de la acumulación de macro y micronutrientes	30
5.9	Determinación de estrés oxidativo <i>in vitro</i> en <i>V. planifolia</i>	31
5.10	Cuantificación de Peroxidación lipídica (MDA).....	31
5.11	Cuantificación de ROS	32
5.12	Cuantificación de la capacidad antioxidante (ORAC)	32
5.13	Extracción de los compuestos fenólicos de plántulas de <i>V. planifolia</i> ...	33
5.14	Determinación de compuestos fenólicos.....	33
5.15	Determinación de citotoxicidad y genotoxicidad <i>in vitro</i> en ápices de raíz de <i>V. planifolia</i>	34
5.16	Análisis estadístico	35
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
6.1	Evaluación de diferentes concentraciones de AgNPs en un SIT (RITA®) para la proliferación de brotes.....	36
6.2	Determinación de la acumulación de macro y micronutrientes	40
6.3	Evaluación del estrés oxidativo.....	44
6.4	Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad de diferentes concentraciones de AgNPs	47
6.5	Inducción de hormé debate por AgNPs en <i>V. planifolia</i>	53
VII.	CONCLUSIONES	55
VIII.	LITERATURA CITADA	56

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Propiedades físicas de la plata metálica.....	14
Cuadro 2. Especies Reactivas a Oxígeno (ROS).....	21
Cuadro 3. Características Físicoquímicas de las AgNPs Argovit™	28
Cuadro 4. Efecto de las AgNPs sobre el porcentaje de contaminación, multiplicación y longitud de los brotes de vainilla (<i>V. planifolia</i>) utilizando un SIT (RITA®).....	36
Cuadro 5. Efecto de las AgNPs sobre la absorción de macro y micro nutrientes en ápices de vainilla (<i>V. planifolia</i>) en medio MS semisólido.....	41
Cuadro 6. Efecto de las AgNPs sobre la formación de Compuestos Fenólicos Totales, Capacidad Antioxidante, Especies Reactivas a Oxígeno y Peroxidación de Lípidos en vainilla (<i>V. planifolia</i>) en medio MS semisólido.....	45
Cuadro 7. Efecto de las AgNPs sobre la elongación y enraizamiento de vainilla (<i>V. planifolia</i>) en medio MS semisólido.....	47
Cuadro 8. Efecto de las AgNPs sobre el Índice Mitótico (IM%) y Aberraciones Cromosomales (AC%) en meristemos apicales de raíz de vainilla (<i>V. planifolia</i>) en medio MS semisólido.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la micropropagación de *V. planifolia* y sus fases de cultivo. **A)** Selección de la planta madre, **B)** Establecimiento, **C)** Multiplicación, **D)** Elongación, **E)** Enraizamiento y adaptación al medio externo (aclimatización).....6

Figura 2. Diseño tecnológico y principio del funcionamiento del sistema RITA[®]. **A)** Período de exposición; **B)** Dislocación del medio líquido. La presión del aire se aplica al compartimiento inferior a través del tubo central. El medio líquido se mueve hacia el compartimiento superior; **C)** Período de inmersión; **D)** Drenado del medio nutritivo. El flujo de aire se detiene y el medio fluye de vuelta al compartimiento inferior debido a la gravedad.....12

Figura 3. Caracterización de las nanopartículas de plata (AgNPs). a) Micrografía de AgNPs funcionales con Polyvinilpirrolidona (PVP) (Vector-Vita Ltd., Rusia) por Transmisión Electrónica (TEM), b) imagen de ángulo alto anular en campo oscuro (HAADF). (Vazquez-Muñoz *et al.*, 2014).....16

Figura 4. Cualquier condición de estrés abiótico conduce a la sobreproducción de ROS. El $\cdot\text{O}_2$ formado puede ser dismutado a H_2O_2 por la superóxido dismutasa (SOD) o convertido en ^-OH . **A)** El H_2O_2 es eliminado por la catalasa (CAT) o, en presencia de agentes reductores, por la ascorbato peroxidasa (APX), **B)** o la glutatión peroxidasa (GPX), **C)** dentro del ciclo ascorbato-glutatión. MDA: monodehidro-ascorbato; DHA, dehidro-ascorbato; GSSG: glutatión disulfuro; MDAR: MDA reductasa; DHAR: DHA reductasa; GR: glutatión reductasa; FS: fotosistema. (Mittler, 2002; Tausz y col., 2004; Gill y Tuteja, 2010).....22

Figura 5. Localización del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Postgraduados (COLPOS) Campus Córdoba.....	27
Figura 6. Efecto de las AgNPs sobre la proliferación de brotes de vainilla (<i>V. planifolia</i>) utilizando un SIT (RITA [®]) a los 30 días de cultivo <i>in vitro</i> . A-E: 0, 25, 50, 100 y 200 mg L ⁻¹ de AgNPs, respectivamente. Barra=2 cm.....	37
Figura 7. Efecto de las AgNPs sobre ápices de vainilla (<i>V. planifolia</i>) en medio MS semisólido a los 45 días de cultivo <i>in vitro</i> . Dosis de izquierda a derecha 0, 25, 50, 100 y 200 mg L ⁻¹ de AgNPs. Barra= 2 cm.....	48
Figura 8. Aberraciones cromosomales y nucleares observadas en células del meristemo apical de la raíz de vainilla (<i>V. planifolia</i>) en medio MS semisólido expuestas a diferentes dosis de AgNPs a los 45 días de cultivo <i>in vitro</i> . A-D) células con micronúcleo, E-F) célula binucleada, G-I) anafase con fragmento cromosomal, J-K) célula en telofase con laggard, L) célula en anafase con puente. Barra= 10µm.....	51

I. INTRODUCCIÓN

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una herramienta invaluable para la resolución de problemas básicos y de aplicación en la biología vegetal, en la investigación fisiológica, bioquímica y genética. Por otro lado, tiene una aplicación práctica en la clonación, conservación y manipulación *in vitro* de especies vegetales (Pérez Molphe-Bach *et al.*, 1999). La micropropagación es un área específica del CTV, la cual consiste en que a partir de un fragmento (explante) de la planta madre, se obtiene una descendencia masiva y uniforme de plantas genéticamente idénticas en poco tiempo (Borges-García *et al.*, 2009). Se estima que el área de plantas producidas por la biotecnología alcanzó aproximadamente 800 millones de hectáreas en todo el mundo desde 1996 a 2008 (James, 2008), pero en estos datos sólo se incluye a los cultivos transgénicos sin considerar las tecnologías de los organismos no modificados genéticamente, como los obtenidos por micropropagación (García-González *et al.*, 2010). En 2005, se estimó la existencia de 196 laboratorios destinados a trabajar en diferentes campos de la biotecnología vegetal en América Latina, de los cuales alrededor de 25 % se dedicaba a la micropropagación de plantas, con una capacidad de producción estimada en 75 millones de vitroplantas producidas por año (Dlahmini *et al.*, 2005). La media de plantas producidas por laboratorio fue de 300,000 vitroplantas (Sasson, 2001). Los países con mayor inversión en el área de la biotecnología en América Latina son: México, Argentina, Brasil, Cuba, Costa Rica, Colombia, Perú y Chile. A pesar de todas las ventajas de esta técnica, presenta algunos obstáculos metodológicos, principalmente la alta y frecuente contaminación de explantes. Por lo tanto, la contaminación interna y externa de los tejidos de la planta resulta ser un problema que prevalece, porque los microorganismos, principalmente hongos y bacterias, pueden crecer mucho más rápido que las células vegetales y competir por los nutrientes, evitando que las

plantas crezcan (Cassells, 1991). Aunque hay una variedad de técnicas para minimizar esta posibilidad de contaminación, el uso de antibióticos es la más frecuente. Sin embargo, los antibióticos son frecuentemente fitotóxicos retardan o inhiben el crecimiento de tejido de la planta (Abdi *et al.*, 2008). También la exposición prolongada de células o tejidos a los antibióticos, resulta en mutaciones de los genes dentro de la orgánulos citoplasmáticos (ADN citoplasmático); así como en el desarrollo de resistencia de las células bacterianas. En el presente escenario, los materiales a nanoescala surgen como nuevos agentes antimicrobianos debido a su alta superficie de contacto, propiedades fisicoquímicas y microbicidas (Morones *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007). En contraste con la atención prestada a las nuevas aplicaciones de las nanopartículas de plata (AgNPs) en la medicina, son pocos los estudios que mencionan la aplicación de las AgNPs en la biotecnología vegetal (Mahna *et al.*, 2013). Las AgNPs son un nuevo nanomaterial con capacidad para eliminar la contaminación por hongos, bacterias y virus sin efectos adversos sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Abdi *et al.*, 2008; Castellano *et al.*, 2007; Safavi *et al.*, 2011; Samarst *et al.*, 2011). Muchos de los aspectos de sus propiedades para controlar la contaminación microbiana se han demostrado, pero el mecanismo de acción de las AgNPs no se ha elucidado totalmente (Arab *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha demostrado también que a bajas dosis, las AgNPs promueven el desarrollo de plantas, fenómeno conocido como horméisis. Esta respuesta de estimulación puede ser vista como "un proceso de compensación adaptativa después de una irrupción inicial en la homeostasis (Calabrese *et al.*, 2016^a). Por lo tanto, en este trabajo, evaluamos el efecto microbicida, hormético y cito-genotóxico de las AgNPs durante la propagación *in vitro* de vainilla (*V. planifolia*) utilizando un Sistema de Inmersión Temporal.

II. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto microbicida y hormético de las nanopartículas de plata (AgNPs) en la propagación *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia*) utilizando un Sistema de Inmersión Temporal.

2.1 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto microbicida de las AgNPs durante la micropropagación de vainilla (*V. planifolia*).
- Determinar la acumulación de macro y micronutrientes en vainilla (*V. planifolia*) durante la micropropagación con AgNPs.
- Determinar la respuesta antioxidante de vainilla (*V. planifolia*) al utilizar AgNPs durante la micropropagación.
- Determinar la citotoxicidad y genotoxicidad de las AgNPs en la micropropagación de vainilla (*V. planifolia*).
- Evaluar el efecto hormético de las AgNPs durante la micropropagación de vainilla (*V. planifolia*).

III. HIPÓTESIS GENERAL

Las nanopartículas de plata (AgNPs) tienen un efecto microbicida y hormético, entonces pueden ser utilizadas para la propagación *in vitro* de plantas de *V. planifolia*, utilizando un Sistema de Inmersión Temporal, donde además de reducir la contaminación promoverán el desarrollo de las plántulas.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)

El CTV es la técnica de crecimiento de células de planta, tejido u órgano en un medio nutritivo preparado artificialmente, semisólido o líquido, bajo condiciones asépticas y se basa en el principio de la totipotencialidad de la célula. Permite la multiplicación y propagación masiva en condiciones *in vitro*, no depende de la temporada para la disponibilidad del material vegetal y permite la obtención de un gran número de plantas si el material disponible es limitado (Sharma y Vashistha, 2015).

Actualmente, el CTV tiene importancia comercial directa y su aplicación en la investigación básica en la biología celular, genética, bioquímica y biotecnología son evidencias de su utilidad (Gamborg, 2002). El CTV no sólo proporciona un método para la propagación masiva de plantas, sino que también hace posible la producción de plantas modificadas genéticamente y libres de enfermedades y proporciona una manera para producción de metabolitos secundarios (Murashige, 1974; Khosroushahi *et al.*, 2006).

4.2 Micropropagación

La micropropagación es una técnica de multiplicación rápida de material vegetal para producir un gran número de plantas de la misma progenie, utilizando métodos de CTV. La micropropagación se utiliza para multiplicar plantas que han sido modificadas genéticamente, cultivadas mediante métodos de fitomejoramiento convencional, plantas que no producen semillas y no responden bien a la reproducción vegetativa (Kaviani, 2015).

La micropropagación se ha convertido en una parte importante de la propagación comercial de muchas plantas debido a sus ventajas como un sistema de multiplicación (Iliev *et al.*, 2010). En la propagación vegetativa el uso de la micropropagación se ha vuelto muy popular debido a su aplicación en la agricultura, la silvicultura y la horticultura. Ha sido posible propagar árboles forestales, cultivar plantas, hortalizas, plantas ornamentales, plantas medicinales, y otras plantas útiles comercialmente utilizando esta técnica. La micropropagación se lleva a cabo en los siguientes pasos: (1) generación de cultivos asépticos, (2) inducción de múltiples brotes, (3) elongación de brotes y proliferación, (4) enraizamiento, endurecimiento, y pruebas de campo (Figura 1) (Singh, 2015).

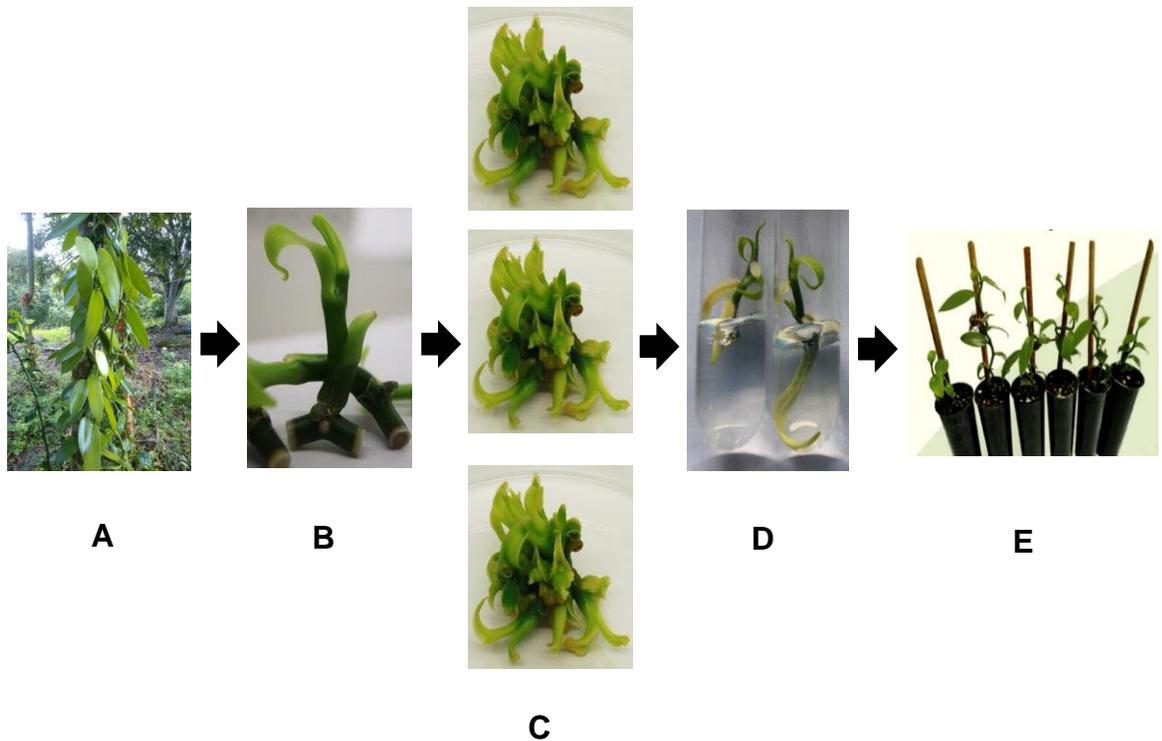


Figura 1. Esquema de la micropropagación de *V. planifolia* y sus fases de cultivo. **A)** Selección de la planta madre, **B)** Establecimiento, **C)** Multiplicación, **D)** Elongación, **E)** Enraizamiento y adaptación al medio externo (aclimatización).

4.3 Micropropagación de *V. planifolia*

La vainillina es uno de los aromas más altamente apreciados en la industria alimentaria, farmacéutica y de fragancias (Bory *et al.*, 2008; Greule *et al.*, 2010) y se extrae de las vainas de *Vainilla planifolia*, una orquídea nativa de los bosques tropicales del sureste de México (Soto Arenas y Cribb 2010; Salazar-Rojas *et al.*, 2012). Esta especie se encuentra en la lista de especies amenazadas debido a la sobreexplotación que ha diezmando la naturaleza de las poblaciones y reducido la diversidad genética (Soto Arenas, 1999; SEMARNAT, 2002).

En México, la vainilla comercial se propaga exclusivamente a través de esquejes. Sin embargo, a causa de un mal control de calidad, este método ha contribuido a la propagación de plagas y enfermedades como el insecto rojo (*Tenthecoris confusus*), pudrición del tallo (*Fusarium oxysporum*) y antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Hernández 2011); todo esto es responsable de las pérdidas financieras significativas en la producción de vainilla (Pinaría *et al.*, 2010). La propagación sexual, por otro lado, tiene la limitación de baja o nula germinación de las semillas (Torres-González *et al.*, 2011).

Por lo tanto, la mejor opción para la propagación de esta especie es el uso de técnicas de micropropagación. Hay varios protocolos de micropropagación para *V. planifolia*, ya sea por organogénesis directa (Geetha y Sudheer, 2000; Giridhar y Ravishankar, 2004; Kalimuthu *et al.*, 2006; Lee-Espinosa *et al.*, 2008; Minno y Nirmal, 2009; Sreedhar, 2009; Zerihun *et al.*, 2009) u organogénesis indirecta (Janarthanam y Seshadri, 2008; Tan *et al.*, 2011). La mayoría de estos protocolos utilizan un medio sólido, y su eficacia es bastante baja teniendo en cuenta que la tasa de multiplicación para la mayoría de los protocolos es más de 60 días (Ramos-Castella *et al.*, 2014).

También el medio de doble fase se ha utilizado durante la etapa de multiplicación (George y Ravishankar, 1997) y medio líquido con agitación en comparación con un medio sólido (Lee- Espinosa *et al.*, 2008) se ha aplicado.

El Sistema de Inmersión Temporal (SIT), entre otras ventajas, permite la semiautomatización del proceso de micropropagación, facilita la renovación del medio, y también combina la aireación e inmersión del explante con la duración y la frecuencia de inmersión programadas, reduciendo así la hiperhidricidad de la planta y aumentando la supervivencia durante la fase de aclimatización (Etienne y Berthouly, 2002; Levin y Tanny, 2004).

4.4 Sistemas de cultivo en medio líquido

A pesar de estas ventajas, la técnica de micropropagación, tiene ciertas desventajas que han limitado el uso y explotación de esta técnica a nivel industrial. La principal limitación es el alto costo de producción de plantas. Por lo tanto, el aspecto más difícil en la actualidad es el reducir los costos de producción, mejorando la eficiencia de la producción sin comprometer la calidad de la planta (Anderson y Meagher, 1977; Sluis y Walker, 1985; Donnan, 1986; Levin y Vasil, 1989; Aitken-Christie, 1991). Por lo tanto, para superar esta limitación, una serie de estrategias de reducción de costos han sido desarrolladas hasta ahora.

La micropropagación de cultivos en agitación utilizando medio de cultivo líquido solo ó en combinación con el medio de cultivo sólido (Debergh y Mane, 1981; Aitken-Christie y Jones, 1987) ha sido desarrollado y utilizado en numerosos trabajos (Earle y Langhans, 1975; Takayama y Misawa, 1981; Takayama, 1991; Paque *et al.*, 1992; Chu *et al.*, 1993). Básicamente se utilizó para embriones somáticos y cultivos de órganos, ambos en frascos de agitación y biorreactores (Smart y Fowler, 1984;

Attree *et al.*, 1994; Taurus y Dunstan, 1995), el medio de cultivo líquido ha sido relativamente menos utilizado con el propósito de micropropagación, sin embargo, ciertos méritos de esta técnica son útiles para demostrar que es uno de los métodos importantes para la reducción de costos de producción durante la micropropagación.

En medio líquido, el estrecho contacto del tejido con el medio puede estimular y facilitar la absorción de nutrientes y fitohormonas, lo que lleva a una mejor proliferación de brotes y crecimiento de las raíces (Ziv, 1989; Smith y Spomer, 1994; Sandal *et al.*, 2001). La desaparición o menor expresión de la dominancia apical, debido a la condición de agitación continua de los tejidos en el medio, es otra característica importante de los cultivos en medio líquido, que generalmente conduce a la inducción y la proliferación de numerosas yemas axilares. Esto conduce al desarrollo controlado de grupos de yemas susceptibles a los componentes del medio, a la separación mecánica y a la inoculación automatizada como en un sistema de suministro eficiente a la etapa final para el crecimiento vegetal (Levin *et al.*, 1997; Ziv *et al.*, 1998).

La formación de estructuras condensadas y organizadas que se reducen a brotes/tejido meristemático en medios líquidos se ha reportado en varias especies vegetales. Además, dentro de las condiciones de agitación del cultivo, la tasa de crecimiento y la multiplicación de los brotes se ve reforzada por aireación forzada, la agitación continua del medio proporciona suficiente suministro de oxígeno al tejido, lo que conduce en última instancia a su crecimiento más rápido. Además de estas ventajas, la preparación de medio líquido y manipulación de cultivos en agitación es más fácil en comparación con el medio de cultivo semi sólido (Mehrotra *et al.*, 2007).

4.5 Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

Dentro de los métodos de multiplicación en medio líquido se encuentran los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), los cuales permiten la automatización de la etapa de multiplicación *in vitro*, en contraste con el medio tradicional semisólido (Ziv, 2000). Los SIT basan su funcionamiento en el contacto del medio de cultivo con los explantes por intervalos de tiempos regulares, por medio del bombeo de aire limpio a través de un filtro. Este método permite que el exceso de líquido en los explantes se drene al finalizar el bombeo y éstos se mantengan húmedos (Santos Pino *et al.*, 2011; Steinmach *et al.*, 2011). Este tipo de sistema reduce los costos de producción de la micropropagación hasta en un 46% con respecto al medio semisólido. Además, es importante resaltar que el uso de este método reduce la mano de obra, al igual que el espacio, lo que facilita la propagación a gran escala, generando un aumento en la productividad y calidad del material propagado (Oviedo-Pereira *et al.*, 2015).

Actualmente existen una amplia gama de modelos y sistemas automatizados que se emplean en la micropropagación de plantas, dentro de los cuales destaca el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT[®]) (Escalona *et al.*, 1999), el Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA[®]) (Alvard *et al.*, 1993), el Biorreactor Modular de Inmersión Temporal (BioMINT[®]) (Robert *et al.*, 2006), el Plantima[®] (A-Tech Bioscientific, 2010) y, más recientemente, el SETIS[™] (SETIS, 2012). Los SIT pueden utilizarse en la propagación masiva de plantas elites, mediante la multiplicación de brotes axilares, microtubérculos y embriones somáticos. Se han señalado experiencias exitosas de micropropagación de frutales, como la uva, *Amelanchier x grandifolia*, bananos, plátanos, cítricos y piña; usando diferentes SIT, y algunas de ellas, se producen en escala comercial (Berthouly y Etienne, 2005).

4.6 Constitución básica de los biorreactores

Un biorreactor es un contenedor autónomo de ambiente estéril que se caracteriza por sistemas de flujo de entrada y salida de nutrientes líquidos y aire. Está diseñado para cultivos intensivos y ofrece la oportunidad para el seguimiento y control de las condiciones micro-ambientales (por ejemplo, agitación, aireación y temperatura) (Watt, 2012). Un gran número de diferentes tipos de biorreactores se han diseñado. Sus principales diferencias radican en los tipos de contenedores y los mecanismos que proporcionan el medio de cultivo (no agitado, mecánico o neumático) (Tisserat y Vandercook, 1985; Aitken-Christie y Davies, 1988; Simonton *et al.*, 1991; Alvard *et al.*, 1993; Escalona *et al.*, 1999; Etienne y Berthouly, 2002; Paek *et al.*, 2001 y 2005).

Mehrotra *et al.*, (2007), analizaron las distintas opciones para la propagación de plantas a gran escala en biorreactores, centrándose en aquellos que involucran cultivos sumergidos, y llegaron a la conclusión de que los tipos de flujo y reflujo tienen varias ventajas, incluyendo el control independiente de cada etapa del cultivo. Los SIT permiten el control de la contaminación, los nutrientes adecuados y el suministro y mezcla de oxígeno, subcultivos relativamente poco frecuentes, facilidad de cambios de medio de cultivo y daños mecánicos limitados. Por estas razones, Ziv (2000 y 2005) y Arencibia *et al.*, (2008), entre otros, han descrito a los SIT como lo "más cercano al cultivo de tejidos naturales".

4.7 El recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA[®])

El RITA[®] (récipient á immersion temporaire automatique), un SIT (CIRAD, Francia, distribuido por VITROPIC, Francia) ha sido desarrollado para uso intensivo en el cultivo *in vitro* de plantas. El sistema consta de un único recipiente de polipropileno autoclavable (500 mL) con dos compartimientos separados por una bandeja instalada con un soporte de malla y un tubo de plástico, montado en su centro (Figura 2).

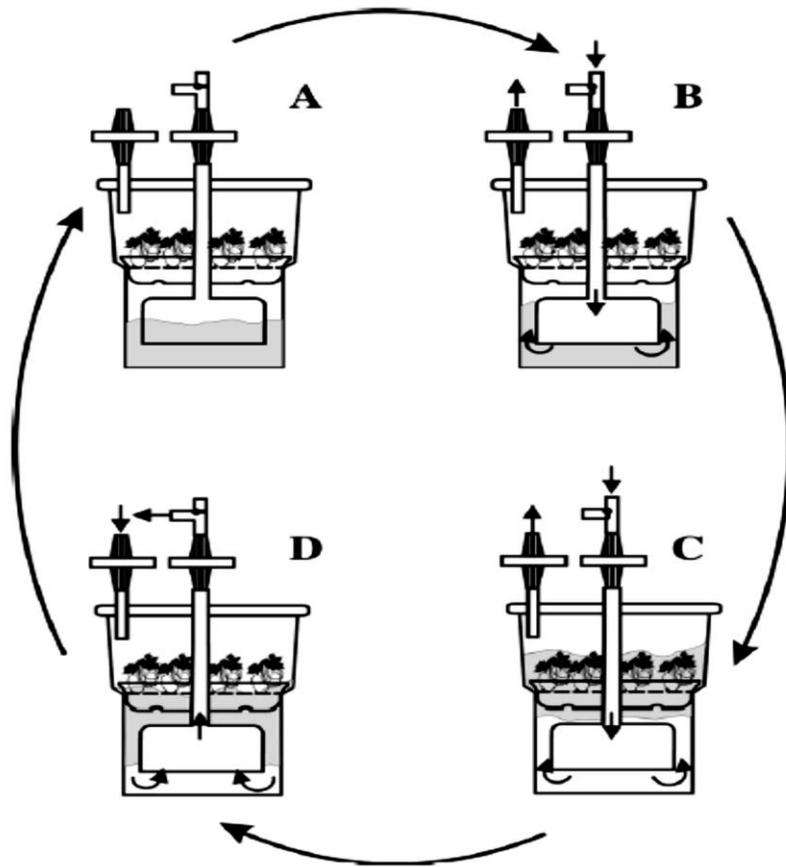


Figura 2. Diseño tecnológico y principio del funcionamiento del sistema RITA[®]. **A)** Período de exposición; **B)** Dislocación del medio líquido. La presión del aire se aplica al compartimiento inferior a través del tubo central. El medio líquido se mueve hacia el compartimiento superior; **C)** Período de inmersión; **D)** Drenado del medio nutritivo. El flujo de aire se detiene y el medio fluye de vuelta al compartimiento inferior debido a la gravedad. Tomado de Georgiev *et al.*, (2014).

El recipiente está cerrado por una tapa de rosca ancha, equipado con puertos externos centrales y laterales en la parte superior. Ambos puertos están asegurados con filtros de membrana, y el puerto central está conectado a una línea aérea controlada por un reloj temporizador y una válvula de solenoide de tres vías. El compartimiento superior del contenedor es la cámara de cultivo, mientras que el compartimento inferior es el tanque de almacenamiento del medio de cultivo. Las ventajas del RITA[®] como SIT son la operación simple y fiable, el espacio compacto de alojamiento en el aparato, y el apoyo de suficiente nivel de humedad relativa con la separación completa de los propágulos y el medio líquido. Todos los elementos internos están conectados uno a otro y pueden manipularse como una sola pieza que facilita el manejo de la biomasa. Las principales desventajas de los sistemas son la incapacidad de renovación medio nutritivo y la falta de opciones para la ventilación forzada y el enriquecimiento de CO₂ (Georgiev *et al.*, 2014); en este trabajo se utilizó un sistema RITA[®].

4.8 Bionanotecnología: aplicación y uso de los nanomateriales

El término "nanomaterial" está basado en el prefijo "nano", que proviene de la palabra griega "νάνος" que significa "enano". Más precisamente, la palabra nano significa 10⁻⁹ o una milmillonésima parte (Huang *et al.*, 2015). La palabra nanomaterial se utiliza generalmente para materiales con un tamaño que oscila entre 1 y 100 nm (Mongillo, 2007; Rai e Ingle, 2012). La nanotecnología puede utilizarse para observar, medir, manipular y fabricar objetos en escala nanométrica (Vyom *et al.*, 2012). Estos nuevos materiales se han aplicado en campos como el textil, la electrónica, la ingeniería y la medicina (Smith *et al.*, 2007; Madhuri *et al.*, 2012; Edhaya Naveena y Prakash, 2013).

La bionanotecnología ha surgido como una integración de la biotecnología y la nanotecnología, para desarrollar la síntesis de nanomateriales (Qi y Wang, 2004; Roduner, 2006; Kathiresan *et al.*, 2009; Rai *et al.*, 2009). La bionanotecnología también se considera como una nueva frontera en el campo médico. Shrivastava *et al.*, (2007) y Kumar *et al.*, (2013) sugirieron que la bionanotecnología puede satisfacer las necesidades de las ciencias médicas en diversas formas, tales como imágenes, sensores, dirección de fármacos, la entrega de genes y los implantes artificiales.

4.9 Nanopartículas de plata (AgNPs)

La Plata (Ag^+), es un metal con una masa atómica de 107,87 a.u.e, tiene un efecto fisiológico pronunciado en el cuerpo, y es resistente al oxígeno atmosférico a temperatura ambiente (Ignatov y Mosin, 2015). Las propiedades físicas de la plata metálica se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Propiedades físicas de la plata metálica.

Propiedad física	Valor
Masa Atomica, a.u.e	107.87
Densidad, g/cm^3	10.49
Punto de fusión, °C	960.5
Punto de ebullición, °C	2210.0
Calor latente de fusión, cal g^{-1}	25.0
Calor específico, $\text{cal}/(\text{g}\cdot^\circ\text{C})$	0.056
Resistencia electrica, $\mu\text{Om cm}^{-1}$	1.62
Conductividad termica, $\text{cal} (\text{cm s}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1})$	0.974

La plata es un elemento brillante, muy dúctil y maleable, un poco más duro que el oro, con símbolo Ag y número atómico 47. Es uno de los elementos básicos que componen nuestro planeta (Keat *et al.*, 2015). En la naturaleza existe como un elemento nativo, como aleación se puede combinar con otros metales (por ejemplo, oro) y con minerales (por ejemplo, Argentita). Químicamente, la plata posee cuatro estados de oxidación diferentes, es decir, Ag^0 , Ag^{1+} , Ag^{2+} , y Ag^{3+} (Riedel y Kaupp 2009).

En soluciones acuosas (la solubilidad de la Ag es de 0.04 mg L^{-1}) los iones de plata en forma Ag^+ son estables durante un largo tiempo, manteniendo la estabilidad de los iones hidratados: $Ag [(H_2O)_2]^+ = 2H^+ + (Ag^+ + 2OH^-)$. El proceso anteriormente descrito es debido a las propiedades de las moléculas polares de agua para interactuar unas con otras por interacciones intermoleculares dipolo-dipolo y puentes de hidrógeno. Como resultado, las moléculas de H_2O se forman alrededor de los iones de Ag^+ en la solución acuosa, capaz de repeler los iones de carga opuesta desde la interacción que es la razón por la cual los iones adquieren una mayor estabilidad en soluciones acuosas (Ignatov y Mosin, 2015).

Los iones de plata Ag^+ y soluciones coloidales (solución de nanopartículas de plata dispersas) (Figura 3) poseen actividad bactericida, viricida y fungicida frente a más de 500 microorganismos patógenos, levaduras, hongos y virus (Bryzgunov *et al.*, 1964). Su efecto antimicrobiano es ligeramente más fuerte que la penicilina y otros antibióticos, debido al efecto inhibitorio sobre cepas resistentes a antibióticos de bacterias (Shahverdy *et al.*, 2007).

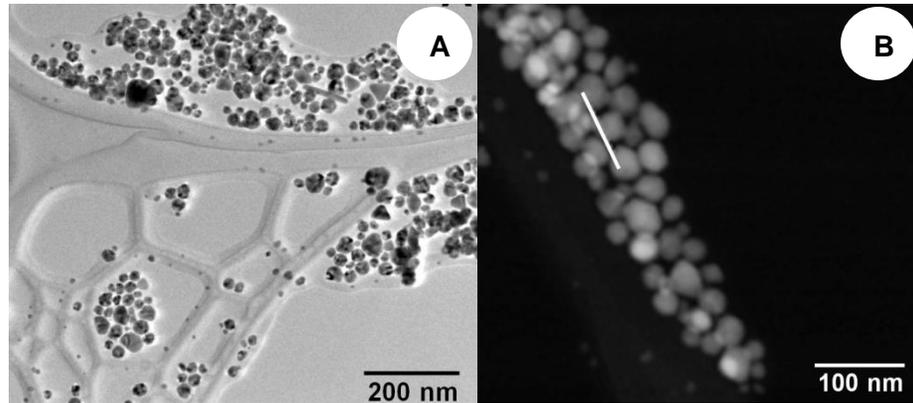


Figura 3. Caracterización de las nanopartículas de plata (AgNPs). **A)** Micrografía de AgNPs funcionales con Polyvinilpirrolidona (PVP) (Vector-Vita Ltd., Rusia) por Transmisión Electronica (TEM), **B)** imagen de angulo alto anular en campo oscuro (HAADF). (Modificado de Vazquez-Muñoz *et al.*, 2014).

El efecto aniquilador de la plata sobre las bacterias es 1500 veces mayor que el fenol en la misma concentración, y 3.5 veces mayor que el cloruro de mercurio. Los iones de Ag^+ ejercen un efecto antimicrobiano así como bacteriostático (capacidad para inhibir el crecimiento microbiano) y bactericida (la capacidad de destruir microbios) en muchos microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* y *Escherichia coli* (Landsdown, 2010).

4.10 Aplicación de las AgNPs en el CTV

Las interacciones de nanomateriales con las plantas no han sido completamente aclaradas. Ha habido diferentes reportes contradictorios sobre la absorción, translocación, acumulación, biotransformación y toxicidad de las nanopartículas en varias especies vegetales (Oukarroum *et al.*, 2013; Almutairi y Alharbi, 2015). Los efectos de las AgNPs son objeto de investigación (Kaegi *et al.*, 2010; Nowack, 2010). El impacto de las AgNPs en plantas superiores parece depender de la especie y la edad de las plantas; el tamaño y concentración de las nanopartículas; las

condiciones de cultivo y el método de exposición (Kaveh *et al.*, 2013; Geisler-Lee *et al.*, 2013; Qian *et al.*, 2013). Por ejemplo, El-Temsah y Joneer, (2012), encontraron que 10 mg L⁻¹ de AgNPs inhiben la germinación de semillas en *Hordeum vulgare* y reducen la longitud de los brotes en lino (*Linum usitatissimum*) y cebada (*Hordeum vulgare*).

Yin *et al.*, (2012), examinaron las respuestas sobre la germinación de once plantas de humedales a AgNPs con diferentes diámetros y estabilizadores (PVP-AgNPs de 20 nm y AgNPs de 6 nm recubiertas de goma arábiga, GA-AgNPs) utilizando dos métodos de exposición: La exposición directa en medios de cultivos y la exposición en suelo. De los experimentos de exposición directa, las PVP-AgNPs no tuvieron ningún efecto sobre la germinación, mientras que 40 mg L⁻¹ de GA-AgNPs redujo significativamente la tasa de germinación de tres especies. Dosis de AgNPs desde 0.2 a 1.6 mg L⁻¹ inhiben la germinación de semillas, actividad de la lipasa, y contenido de azúcares solubles y reductores en semillas germinando y germinadas de *Brassica nigra* (Amooaghaiea *et al.*, 2015). Kaveh *et al.*, (2013), reportaron que en plantas de *Arabidopsis thaliana* con dosis de 1 a 2.5 mg L⁻¹ de AgNPs aumentó la biomasa, en contraste altas concentraciones disminuyeron la biomasa. Sin embargo, las AgNPs no tienen efectos significativos sobre la germinación de las semillas, longitud de la raíz, o longitud de brotes de la planta de ricino, *Ricinus communis* L. (Yasur y Rani, 2013) o *Vicia faba* (Abdel-Azeem y Elsayed, 2013) aún en altas concentraciones de AgNPs. En dosis de 100 mg L⁻¹ de AgNPs se encontró que no se tiene efecto significativo sobre la germinación de semillas en *Cucumis sativus* o *Lactuca sativa* (Barrena *et al.*, 2009). Otros estudios indican que las AgNPs pueden promover el crecimiento de *Brassica juncea* (Sharma *et al.*, 2012), *Panicum virgatum* y *Phytolacca americana* (Yin *et al.*, 2012), *Phaseolus vulgaris* o *Zea mays* (Salama, 2012). Vannini *et al.*, (2013), reportaron que una dosis de 10 mg L⁻¹ de AgNPs recubiertas con polivinilpirrolidona como estabilizador (PVP-

AgNPs) aumentó la elongación de raíz en *Eruca sativa*. La germinación de semillas de *Boswellia ovalifoliolata* (Savithamma *et al.*, 2012) y *Pennisetum glaucum* (Parveen y Rao, 2014) ha demostrado ser afectada positivamente por los tratamiento de AgNPs.

4.11 Cito-Genotoxicidad *in vitro* por exposición a AgNPs

Las AgNPs son consideradas un candidato ideal para numerosas aplicaciones en diversos campos, especialmente en la industria biomédica. Sin embargo, varios estudios informan que las AgNPs tienen un efecto adverso sobre los seres humanos, así como el medio ambiente. En investigaciones toxicológicas de AgNPs, se realizó un ensayo de toxicidad *in vitro* en células de hígado de rata y se demostró que las AgNPs causan estrés oxidativo y cesa de la función mitocondrial, incluso a bajo nivel de exposición a las AgNPs (10-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Keat *et al.*, 2015).

El uso de microorganismos, animales y cultivos de células humanas para la evaluación de la toxicidad comenzaron a finales del siglo pasado (Wilsnack *et al.*, 1973; Grant, 1994; Battersby, 2000; Parng, 2005). Los bioensayos a base de plantas han sido validados por el Programa de Medio Ambiente de las Naciones Unidas (PNUMA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US-EPA) (Grant, 1999; Rizzo, 2011). Los bioensayos basados en vegetales son generalmente más sensibles para detectar mutágenos, evaluar varios puntos genéticos, que oscilan entre mutaciones puntuales hasta aberraciones cromosómicas y son menos caros (Grant, 1994; Clemedson *et al.*, 1996; Grant, 1999; Leme y Marin-Morales, 2009; Iqbal, 2016). Las plantas superiores, es decir, *Allium cepa*, *Zea mays*, *Tradescantia*, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillares*, *Hordeum vulgare* y *Vicia faba* (haba) se han utilizado ampliamente para detectar y evaluar la toxicidad de los productos químicos tóxicos (Grant, 1994; Leme

y Marin-Morales, 2009; Iqbal y Bhatti, 2014, 2015; Iqbal *et al.*, 2014; Iqbal y Nisar, 2015; Qureshi *et al.*, 2015).

Entre las plantas superiores, *V. faba* se considera como excelente modelo genético para la supervisión de toxicidad, ya que ofrece la detección de daños en el ADN o anomalías en la división celular (Valencia, 1992; Feng *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2010; Giorgetti *et al.*, 2011; Shahid *et al.*, 2011). Los cromosomas presentes en *V. faba* tienen el tamaño para realizar un estudio citológico, se distinguen con claridad en el análisis al microscópico; otra de las ventajas para su estudio es que se conocen perfectamente los tiempos de cada una de las etapas de su ciclo celular, siendo la duración total de éstas 19 h y 30 min a 19 °C; aunado a que en los meristemas apicales hay una gran cantidad de células indiferenciadas en división, lo que favorece los estudios de citotoxicidad (Evans y Scott, 1964).

El daño cito-genotóxico puede ser de dos tipos, espontáneo e inducido (por factores externos), el primero ocurre en los procesos de transmisión y síntesis del DNA para ser expresado como aberraciones, se le denomina S-independiente, pudiendo ser las alteraciones provocadas del tipo cromatídico y cromosómico; mientras que las alteraciones que requieren pasar por una etapa de síntesis para poder expresarse se les denomina S-dependientes, y son alteraciones del tipo sub-cromatíco (Prieto-García *et al.*, 2006).

Así como también, ha habido pocos estudios publicados sobre las plantas vasculares se mostró que las AgNPs tienen efectos perjudiciales sobre el crecimiento en plantas (Stampoulis *et al.*, 2009). Stampoulis *et al.*, (2009), informaron que AgNPs de 100 nm a 100 y 500 mg L⁻¹ redujeron en un 41 % y 57% las tasas de biomasa y la respiración, respectivamente, de *Cucurbita pepo*, comparadas con las plantas control. Gubbins *et al.*,

(2011), demostraron que las AgNPs podrían inhibir el crecimiento de *Lemna minor*. Kumari *et al.*, (2009) y Pulate *et al.*, (2011), investigaron que las AgNPs tuvieron impactos citotóxicos y genotóxicos sobre meristemas de *Allium cepa*. Abdel-Azeem y Elsayed, (2013), mostraron que diferentes concentraciones AgNPs indujeron diferentes tipos de aberraciones cromosómicas tales como cromosomas pegajosos, puente de la cromatina, roturas cromosómicas, metafase perturbada y micronúcleos (Mn). Por lo tanto, el mecanismo citotóxico de AgNPs se basa predominantemente en la inducción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Específicamente, la exposición a las AgNPs provoca agotamiento en el nivel de glutatión, la elevación de los niveles de ROS, la peroxidación de lípidos, y aumento de la expresión de genes de respuesta a ROS, lo que lleva al daño del ADN, la apoptosis y necrosis (Haider y Kang, 2015).

4.12 Estrés oxidativo y generación de Especies Reactivas a Oxígenos (ROS) por exposición a AgNPs

El estrés oxidativo es un factor central en los fenómenos de estrés abióticos y bióticos que se produce cuando hay un desequilibrio grave en cualquier compartimiento celular, entre la producción de Especies Reactivas a Oxígeno (ROS) y la defensa antioxidante, lo que lleva a eventos fisiológicos dramáticos (Foyer y Noctor, 2000). Las ROS se han considerado principalmente como moléculas peligrosas, cuyas concentraciones deben mantenerse lo más bajo posible, pero este concepto se ha cambiado a causa de las múltiples funciones del oxígeno activado. Por lo tanto, es importante para las células controlar la concentración de ROS, pero no de eliminarlas completamente (Schützendübel y Polle, 2002; Gratao *et al.*, 2005).

Durante la reducción de O_2 a H_2O , puede haber transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 para formar superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), respectivamente. $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 tienen una reactividad relativamente baja en comparación con otras ROS (Cuadro 2).

Cuadro 2. Especies Reactivas a Oxígeno (ROS).

	ROS	Símbolo
Radicales	Anion superóxido	$O_2^{\cdot-}$
	Hidroxilo	$\cdot OH$
	Alcóxido	$RO\cdot$
	Peróxido	$ROO\cdot$
No radicales	Peróxido de hidrogeno	H_2O_2
	Ozono	O_3
	Oxígeno singulete	$^1\Delta O_2$

La aceptación del exceso de energía por O_2 puede llevar, además, a la formación de oxígeno singlete (1O_2), una molécula altamente reactiva en comparación con el O_2 . El H_2O_2 funciona como una molécula de señalización en plantas y que también está implicado en la regulación de la expresión génica por estrés abiótico (Neill *et al.*, 2002). Puede inducir el cierre de los estomas o puede ser requerido para inhibir ABA en la apertura de los estomas a la luz (Desikan *et al.*, 2004). El H_2O_2 es también un producto del glioxisoma asociado a la β -oxidación de los ácidos grasos y a las reacciones de la fotorrespiración peroxisomal (Scandalios, 1993; Igamberdiev y Lea, 2002). Las plantas, así como otros eucariotas poseen una variedad de enzimas que producen ROS apoplástico, que luego utilizan para la transducción de señal, así como en el metabolismo de la pared celular. Las enzimas productoras de ROS en plantas incluyen a las oxidasas (NADPH), amino oxidasas, quinona

reductasas, lipoxigenasas, las peroxidasas de clase III y oxalato oxidasas (Kärkönen y Kuchitsu, 2015) (Figura 4).

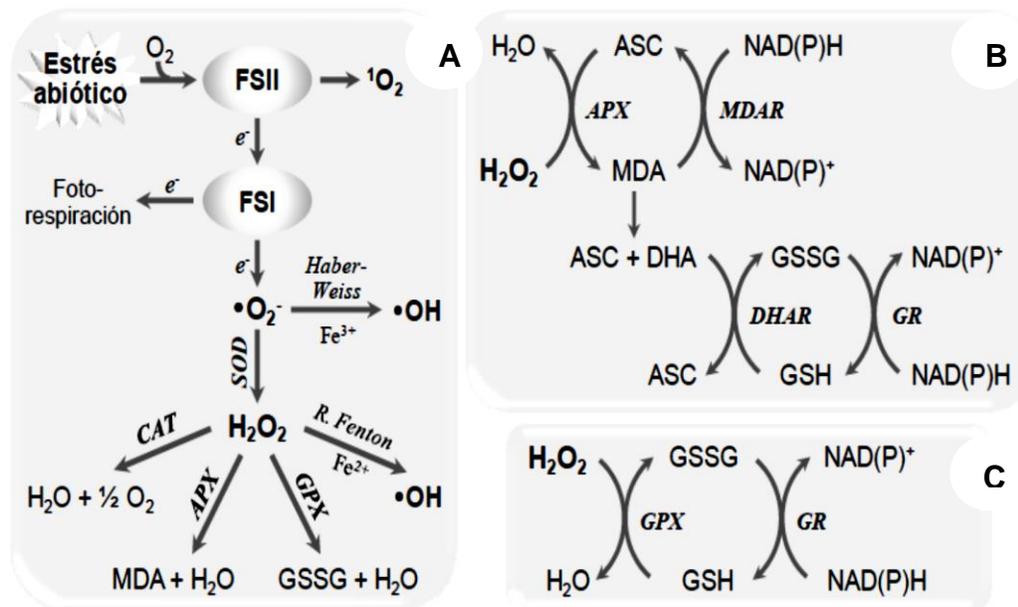


Figura 4. Cualquier condición de estrés abiótico conduce a la sobreproducción de ROS. El $\cdot\text{O}_2^-$ formado puede ser dismutado a H_2O_2 por la superóxido dismutasa (SOD) o convertido en $\cdot\text{OH}$. **A)** El H_2O_2 es eliminado por la catalasa (CAT) o, en presencia de agentes reductores, por la ascorbato peroxidasa (APX); **B)** o la glutatión peroxidasa (GPX); **C)** dentro del ciclo ascorbato-glutiación. MDA: monodehidro-ascorbato; DHA, dehidro-ascorbato; GSSG: glutatión disulfuro; MDAR: MDA reductasa; DHAR: DHA reductasa; GR: glutatión reductasa; FS: fotosistema (Mittler, 2002; Tausz y col., 2004; Gill y Tuteja, 2010).

Las catalasas (CAT) son enzimas que contiene hematina que facilitan la eliminación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a partir de organismos (Van der Oost *et al.*, 2003) y también están asociadas con el metabolismo de los ácidos grasos (Huggett *et al.*, 1992; Stegeman *et al.*, 1992). La glutatión peroxidasa cataliza la reducción de hidroperóxidos utilizando glutatión (GSH) y protege las células contra el daño oxidativo. La Superóxido Dismutasa (SOD) son enzimas antioxidantes que catalizan la dismutación del superóxido en O_2 y H_2O_2 . El peróxido puede ser destruido por CAT o reacciones GPx (Walters *et al.*, 2014). Las enzimas (como la glutatión S-transferasa (GST) y lactato deshidrogenasa (LDH)) son

ampliamente utilizadas como biomarcadores ambientales, ya que desempeñan un papel fisiológico vital (Elumalai *et al.*, 2007). El glutatión S-transferasa (GST) está implicado en el transporte intracelular y ofrece defensa contra el daño oxidativo y a los productos peroxidativos de ADN y lípidos (Van der Oost *et al.*, 2003).

Estudios de toxicidad en plantas por exposición a AgNPs, en contexto con el estrés oxidativo y su metabolismo no han sido muy explorados. La generación elevada de ROS ha sido reportada en especies vegetales como *Oriza sativa* expuestas a AgNPs (Mirzajani *et al.*, 2013). Sin embargo, hay poca información disponible sobre mecanismos de adaptación de plantas expuestas a AgNPs y el metabolismo de ROS y sus productos de reacción. Como se informó anteriormente, Mirzajani *et al.*, (2013), reportaron que en las plantas de *O. sativa* expuestas a AgNPs, se incrementó la actividad antioxidante de los carotenoides, como mecanismo de respuesta para la reducción de efectos tóxicos de ROS y sus productos de reacción (Chew y Park 2004; He *et al.*, 2011). En comparación con las AgNPs, se informó de un mayor grado de estrés oxidativo inducido por una mayor generación de O_2^- y H_2O_2 en puntas de raíces de *Allium cepa* bajo la exposición a AgNPs (Choi y Hu, 2008; Panda *et al.*, 2011).

Desde la aplicación de AgNPs para controlar varias enfermedades en plantas (Park *et al.*, 2006). Krishnaraj *et al.*, (2012), reportaron un estrés leve, sin embargo, las elevaciones más bajas de CAT y POX reflejaron un mejor crecimiento de *B. monnieri* con reducida toxicidad por AgNPs biológicamente sintetizadas por *B. monnieri*, en comparación con las plantas tratadas con $AgNO_3$; Además, especularon que el estrés leve debido a las AgNPs sintetizadas biológicamente puede ser beneficioso para las plantas en su protección contra los ataques de patógenos y el control de enfermedades lo que demanda estudios a futuro.

Yasur y Rani, (2013), reportaron en *R. communis* expuesta a AgNPs y AgNO₃ a concentraciones de 0, 500, 1000, 2000, y 4000 mg L⁻¹, respectivamente, una elevada actividad de la enzima SOD y peroxidasa. Los autores llegaron a la conclusión de que la mejora en las actividades de peroxidasa y SOD son indicativos del aumento del estrés oxidativo acumulado por las AgNPs donde las AgNPs podrían haber interactuado con componentes celulares y causando incremento en la producción de ROS (Anjum *et al.*, 2013).

4.13 Interacción de las AgNPs con Macro y Micronutrientes

De los diferentes tipos de nanomateriales, incluidos los fabricados a partir de elementos que no se clasifican tradicionalmente como nutrientes (por ejemplo, titanio, silicio, plata) y de micronutrientes con nanoformas tales como Zn, Fe y Mn, se ha demostrado que son capaces de mejorar el crecimiento del cultivo y/o el contenido de estos elementos (Larue *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013^{a, b y c}; Siddique y Al-Whaibi 2014; Servin *et al.*, 2015).

A menudo, los efectos positivos de las nanopartículas (NPs) en el crecimiento del cultivo se producen en mayor medida con la dosis equivalente del mismo nutriente mineral presentado en su forma iónica (sal) (Alidoust e Isoda 2013; Pradhan *et al.* 2013; Zhao *et al.* 2013; Kim *et al.* 2014), y cuando se aplica a la misma concentración en relativamente altas dosis, la concentración a la que se produce toxicidad es menor con iones que con NPs (Dimkpa *et al.*, 2012^a; Pradhan *et al.* 2013; Kim *et al.*, 2014).

Por otro lado, las NPs no se comportan igual como agregado cuando entran al medio ambiente. Factores externos como la luz, la temperatura, el pH, etc., pueden cambiar su destino y transporte (Arruda *et al.*, 2015; Nowack y Bucheli, 2007).

Las posibles interacciones de las nanopartículas con las raíces de las plantas incluyen la absorción sobre la superficie de la raíz, la incorporación en la pared celular y la captación por la célula (Nowack y Bucheli 2007; Zhang *et al.*, 2015^a).

Generalmente es difícil para las NPs <20 nm penetrar a través de la pared celular, ya que los tamaños de la pared celular de poro varían de 2 a 20 nm (Rondeau-Mouro *et al.* 2008; Rico *et al.*, 2011). Como resultado, las NPs pueden agregarse a lo largo de las raíces, lo que podría perturbar su absorción de agua adecuada y en última instancia, afectar a su crecimiento y desarrollo. De esta manera, la inhibición del crecimiento de las plantas puede no derivarse directamente de la fitotoxicidad química de las NPs. En lugar de ello, la toxicidad puede ser el resultado de las interacciones físicas entre las nanopartículas y las vías de transporte célula vegetal (Ma *et al.*, 2010^a; Martínez-Fernández *et al.*, 2015).

Las AgNPs son excelentes materiales que tienen propiedades microbicidas y son utilizados en alimentación y la agricultura como la seguridad alimentaria, envasado de alimentos y detección de patógenos (Quardos y Mar, 2010). Tienen gran influencia en el crecimiento de plantas y el desarrollo, tales como la germinación, raíces y brotes relación, el crecimiento de las plántulas, el crecimiento de raíces, alargamiento de la raíz, y la inhibición de la senescencia (Ma *et al.*, 2010; Shah y Belozeroova, 2009). La Nano-bentonita y el nanocarbono activado con recubrimiento de nitrógeno aumentó la absorción y el transporte de N, P, K a las semillas y rendimiento del arroz de manera significativa (Wang *et al.*, 2011). El Nanocarbono como fertilizante de liberación lenta aumento el contenido de la clorofila, el rendimiento de grano y el uso de nitrógeno la eficiencia de arroz (Wu *et al.*, 2010).

La aplicación de liberación controlada de fertilizantes recubiertos por algún tipo de nanomaterial aumentó en China el rendimiento de la col y la mejora de la eficiencia de uso de nutrientes de manera directa y significativamente en comparación con fertilizantes comunes (Ding *et al.*, 2009).

Por otra parte, las limitaciones socioeconómicas han hecho que sea más imperativo el incrementar el uso y eficiencia de nutrientes. Por lo tanto, el aumento de la eficiencia de uso de nutrientes continúa siendo un reto importante para el mundo de la agricultura, y la nanotecnología puede potencialmente abordar esta cuestión.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ubicación del experimento

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales 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 (Figura 5).

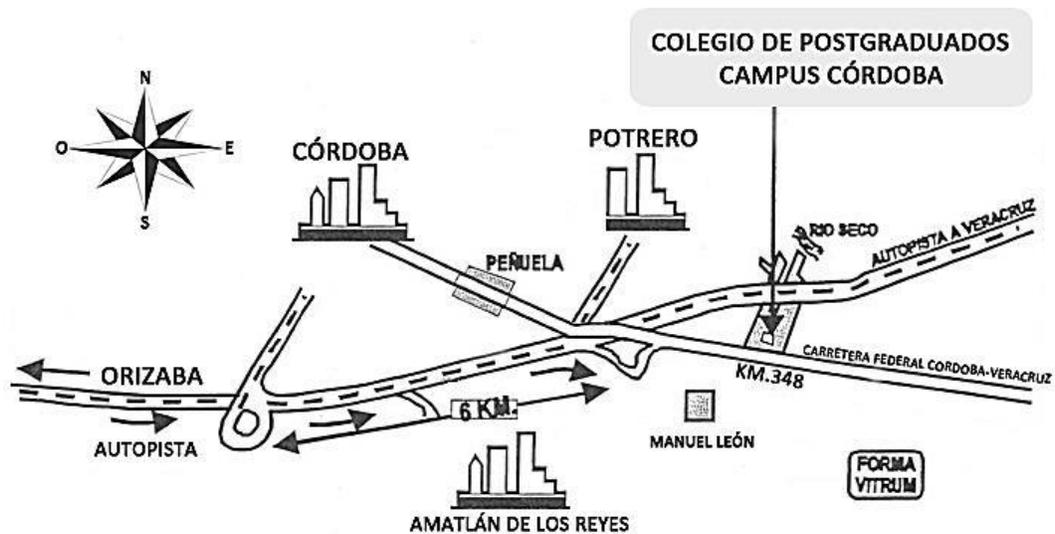


Figura 5. Localización del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Postgraduados (COLPOS) Campus Córdoba.

5.2 Material vegetal

Se utilizaron plántulas de vainilla (*V. planifolia*), previamente establecidas por cultivo *in vitro* para la multiplicación de los explantes y proliferación de brotes en un SIT (RITA[®]) con AgNPs a diferentes concentraciones y posteriormente se seleccionaron ápices para elongación los cuales fueron

sometidos a ensayos de cito-genotoxicidad y estrés oxidativo *in vitro* con AgNPs a diferentes concentraciones.

5.3 Características de las nanopartículas de plata (AgNPs)

Las AgNPs utilizadas en este estudio fueron proporcionadas mediante un convenio entre el COLPOS-Córdoba y el CNYN-UNAM. Las AgNPs están recubiertas por un polímero de Polivinilpirrolidona (PVP) como estabilizador y su tamaño promedio oscila entre 2-50 nm de forma esférica. Las soluciones de AgNPs de Argovit™ se encuentran en concentración de 20 y 40%, con un contenido de plata metálica al 1.2 y 2.4% respectivamente, para este estudio se utilizó una concentración de 20% (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características Físicoquímicas de las AgNPs Argovit™.

Propiedades	Resultado
Contenido de plata metálica (% wt.)	1.2
Contenido de PVP (% wt.)	18.8
Morfología de las nanopartículas de plata	Esferoidal
Promedio del diámetro de las nanopartículas de plata por datos TEM (nm)	35
Intervalo de tamaño de las partículas de plata metálica por datos TEM (nm)	1 a 90
Diámetro Hidrodinámico: Ag metálica con PVP (nm)	70
Potencial Zeta (mV)	-15
Superficie de resonancia plasmónica:	420 nm
Estructura PVP por FTIR	Confirmada

5.4 Lavado, desinfección y establecimiento de explantes

Se emplearon como explantes, yemas y apices de plantas de vainilla (*V. planifolia*) recolectadas en Miradores, Veracruz, México. Se lavaron bajo un flujo de agua corriente por 45 minutos. Posteriormente se mantuvieron en agitación por 30 minutos en una solución de Benomilo 1 g L⁻¹ (Promyl[®]). Una vez en la cámara de flujo laminar se procedió a desinfectar los explantes en soluciones de etanol al 70% v/v durante 30 s y cloro comercial (hipoclorito de sodio) al 10% v/v durante 20 minutos. Finalmente se aplicaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Después de este tratamiento los explantes se sumergieron nuevamente por 10 minutos en una solución al 5% de cloro comercial y se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril. Los explantes se cultivaron en medio de multiplicación MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2 mg L⁻¹ de benciladenina (BA) y 30 g L⁻¹ de sacarosa de acuerdo con la metodología propuesta por Lee-Espinoza *et al.*, (2008) para la obtención de brotes y llevar a cabo la parte experimental.

5.5 Preparación de medio MS para la fase de multiplicación con AgNPs en RITA[®]

El medio líquido empleado para el cultivo *in vitro* fue MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa. Se ajustó el pH a 5.8 ± 0.1 con NaOH 1.0 N y/o HCl 1.0 N, según correspondiera. Los medios fueron esterilizados en autoclave a una presión de 15 psi o 1.05 Kg/cm² equivalentes a una temperatura de 121°C durante 30 min para los SIT. Se adicionó al medio de cultivo con micropipeta las concentraciones de AgNPs (0, 25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹) de los tratamientos correspondientes. Se colocaron por Biorreactor 5 explantes cada uno con 2-3 brotes y se realizaron tres repeticiones por tratamiento en tres replicas. El medio de cultivo se dosificó en los biorreactores RITA[®], a razón de 200 mL y se utilizó una frecuencia de inmersión de dos minutos

cada 4 horas. Se analizaron las variables de multiplicación de los explantes a los 30 días de cultivo.

5.6 Preparación del medio MS semisólido para la fase de elongación y enraizamiento con AgNPs

Para la etapa de elongación se utilizó medio MS sin reguladores de crecimiento. Para el medio semisólido se usó 2.3 g L⁻¹ de phytigel™ (SIGMA®) como agente gelificante y 30 g L⁻¹ de sacarosa. El pH de los medios fue ajustado a 5.7-5.8. El medio fue colocado en microondas para calentamiento y se dejó enfriar en campana de flujo laminar, antes de gelificar se adicionó al medio de cultivo con micropipeta las concentraciones de AgNPs (0, 25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹) de los tratamientos correspondientes. Se adicionaron 15 mL de medio de cultivo por tubo con un total de 10 repeticiones por tratamiento por triplicado. Se analizaron las variables de elongación de los ápices a los 45 días de cultivo.

5.7 Condiciones de incubación

Los recipientes de cultivo tanto semisólido y líquido, fueron incubados a 24±2 °C y se mantuvieron bajo luz fluorescente (40-50 μmol m⁻²s⁻¹) con fotoperíodo de 16:8 h luz/oscuridad.

5.8 Determinación de la acumulación de macro y micronutrientes

El método empleado en este trabajo para la determinación de macro y micronutrientes fue espectrofotometría de absorción atómica según se describe en Perkin Elmer (1996). Se utilizó 1 g de tejido foliar el cual se colocó en una mufla a 550 °C hasta obtener ceniza para cuantificar los minerales. La ceniza obtenida fue disuelta en 1,5 N de HCl, filtrada después a través de un papel filtro y aforado con agua desionizada. Los Macronutrientes determinados fueron Ca, Mg, K, Fe y micronutrientes

como Cu, Zn and Mn utilizando espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer AAnalyst 400). El contenido de Fósforo (P) fue determinado utilizando el método de Vanadio-Molibdato y leído en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV-Vis a 630 nm (AOAC, 1990). El contenido de Boro (B) fue determinado por el método espectrofotométrico con curcumina a 540 nm. El contenido de Nitrógeno Total (NT) fue determinado por digestión con ácido sulfúrico seguido de destilación con NaOH, utilizando de 0.5 a 1 g de tejido foliar de acuerdo con el método por micro-Kjeldahl (Kjeldahl, 1883). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

5.9 Determinación de estrés oxidativo *in vitro* en *V. planifolia*

Para la determinación de estrés oxidativo, ápices para elongación se colocaron en medio semisólido Murashige y Skoog (1962); con diferentes concentraciones de AgNPs (0, 25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹). Se determinaron los niveles de ROS, peroxidación lipídica (MDA), capacidad antioxidante (ORAC) y compuestos fenólicos totales (TPC) en plántulas completas a los 30 días de cultivo.

5.10 Cuantificación de Peroxidación lipídica (MDA)

Un total de 200 mg de los brotes de vainilla secados en frío fueron homogenizados en 4 mL de Ácido Tricloroacético (TCA) al 0.1%. Después, el extracto fue centrifugado a 10,000 r.p.m. por 15 min y el sobrenadante (1 mL) fue colectado y mezclado con 2 mL de TCA al 20% and 2 mL de Ácido Tiobarbitúrico (TBA) al 0.5%. La mezcla fue calentada a 95°C por 30 min en una campana de extracción de gases y posteriormente enfriada en hielo. La absorbancia del sobrenadante fue registrada a 532 nm y 600 nm (Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, VM). La concentración del Malonilaldehído (MDA), formado por la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados, fue calculada usando la ecuación de

Beer–Lambert's (coeficiente de extinción molar del MDA is $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

5.11 Cuantificación de ROS

La determinación de ROS fue realizada mediante un ensayo directo colorimétrico y fluorométrico, que mide el Peroxido de Hidrógeno (H_2O_2) como un subproducto del metabolismo reactivo a oxígeno. El kit-ab102500 (CRT scientific, México) fue empleado para el ensayo de la determinación del Peróxido de Hidrógeno. La determinación fue realizada de acuerdo a las indicaciones del proveedor, brevemente 5 mg de brotes de vainilla secados en frío fueron homogenizados en una solución fría de buffer de fosfatos y lavados por centrifugación durante 2-5 min a 4°C y 1000 r.p.m. para remover cualquier material insoluble. El sobrenadante fue colectado, transferido a un tubo limpio y mantenido en hielo para la deproteinización con Acido Perclórico (PCA) 4 M. PCA al 4 M fue agregado para obtener una concentración final 1 M, la mezcla fue vortexeada e incubada en hielo por 5 min. El PCA fue precipitado por neutralización con KOH al 2 M. después la mezcla fue centrifugada a 10 000 r.p.m. por 20 min a 4°C y el sobrenadante fue colectado. Las muestras desproteinizadas fueron utilizadas para la determinación de Peroxido de Hidrogeno. Para calcular la concentración de un factor de dilución de la muestra final fue calculado, tomando en cuenta el volumen de la muestra inicial + vol PCA + vol KOH. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

5.12 Cuantificación de la capacidad antioxidante (ORAC)

La capacidad antioxidante (ORAC) fue determinada de acuerdo al método descrito por Huang *et al.*, (2002). Brevemente, un gramo del extracto secado en frío de los brotes de vainilla fueron diluidos en metanol para la cuantificación, los análisis se realizaron a 37°C usando un buffer de

fosfatos de pH 7.4. Los radicales peróxido fueron producidos por 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH), usando fluoresceína como sustrato y Trolox como estandar. La Fluorescencia fue medida cada 2 min durante una hora y una curva de calibración de Trolox a diferentes concentraciones (10 a 100 μ M) fue utilizada para cada placa de lectura. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

5.13 Extracción de los compuestos fenólicos de plántulas de *V. planifolia*

Brotos individuales de vainilla que crecieron con AgNPs a diferentes concentraciones fueron colocados en extracción por 3 h a 250 r.p.m. con metanol al 50 % y agua (v/v) utilizando una proporción masa-solvente de 1:10 (w/v) a 30 °C. El sobrenadante fue recuperado y filtrado al vacío con un papel filtro Whatman No. 1. El extracto resultante fue concentrado en un rotavapor para remover el metanol. La temperatura del baño maría fue establecida a 60 °C, y la presión de la bomba de vacío a un rango de -70 a -90 kPa. Después de que el metanol ha sido removido, el concentrado del extracto fue liofilizado, y el polvo resultante del secado en frío fue conservado a -80 °C.

5.14 Determinación de compuestos fenólicos

El contenido total de los compuestos fenólicos (TPC) de las plantas de vainilla fueron determinados el método Folin–Ciocalteu de Payet *et al.*, (2006) con ligeras modificaciones. Brevemente, diluciones apropiadas del extracto secado en frío en metanol fueron transferidos a una microplaca de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark) y oxidadas con el reactivo Folin-Ciocalteu a temperatura ambiente por 5 min, resultando en una coloración azul de la reacción. Después de esto, carbonato de sodio al 2% fue agregado a la microplaca. La microplaca fue inmediatamente colocada y

agitada en un lector de microplacas (Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, VM) y después se dejó reposando por 15 min.

La absorbancia fue registrada a 760 nm y el TFP fue calculado desde una curva de calibración de ácido galico (10–150 µg/ml) y expresado como miligramos equivalentes de ácido galico (GAE) por gramo de muestra. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

5.15 Determinación de citotoxicidad y genotoxicidad *in vitro* en ápices de raíz de *V. planifolia*

Se utilizaron plántulas de *V. planifolia*, previamente establecidas en medio semisólido Murashige y Skoog (1962); con diferentes concentraciones de AgNPs (0, 25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹), donde se colocaron ápices de 2 cm de longitud para determinar la cito-genotoxicidad en raíces. Las raíces de los ápices se evaluaron con respecto a las variables de cito-genotoxicidad a los 45 días de cultivo. Se utilizaron raíces de 2 cm de longitud para el protocolo de cito-genotoxicidad.

El estudio se realizó de acuerdo al protocolo de Ma *et al.*, (1995), se cortaron las puntas de las raíces a 2 mm del meristemo apical y se cortó una sección superior a esta de 0.5-1 cm, posteriormente se colocan en vasos de p.p. o caja de Petri cubiertos con papel aluminio para proteger de la luz con 10 mL de solución fijadora (metanol-Ac. Acético) proporción 3:1 (v/v) por un lapso de 12 h a temperatura ambiente. Posteriormente, al utilizarlas, se lavaron las puntas de las raíces varias veces con agua destilada. Posteriormente se hidrolizaron en 10 mL de HCl 1M a 60 °C por 10 min. en baño maría, se enjuagaron con agua destilada varias veces. Después de la hidrólisis, se tiñeron las raíces en 3 mL de Aceto-orceina durante 30 min. Se lavó el material vegetal en ácido acético al 45% (v/v) para decolorar excedente. Se colocaron las puntas de las raíces en el portaobjetos limpio, y se colocó un cubreobjetos y se aplasto por (squash)

suavemente para lograr una mono capa de células. Se observó con el objetivo 40x en un microscopio óptico marca Olympus.

La cantidad de 3000 células por tratamiento con AgNPs registrando el número de células en división (Índice Mitótico (IM) y las Aberraciones Cromosomales (AC) como micronúcleos (Mn), buds, células binucleadas, necrosis y apoptosis en el estado basal de las células vegetales.

Índice mitótico (IM):

El índice mitótico se calculó como la relación entre el número de células en división entre el número total de células contabilizadas, multiplicado por 100.

5.16 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, las valuaciones de los parámetros de crecimiento y formación de nuevos brotes así como los parámetros de la inducción de cito-genotoxicidad y estrés oxidativo por las AgNPs se procesaron utilizando el paquete estadístico SPSS 22 (para Windows). Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y comparación de medias de acuerdo a Tukey ($p \leq 0.05$), cuando fue requerido.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación de diferentes concentraciones de AgNPs en un SIT (RITA[®]) para la proliferación de brotes

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las diferentes concentraciones de AgNPs para las variables evaluadas a las 4 semanas de cultivo *in vitro* por inmersión temporal (Cuadro 4). El mayor número de brotes por explante (14.89 ± 0.40) y mayor longitud del brote (4.71 ± 0.23) se obtuvieron en el tratamiento con la concentración de 50 mg L^{-1} de AgNPs. Las concentraciones de 100 y 200 mg L^{-1} mostraron significativamente el menor número de brotes por explante (8.29 ± 0.35 y 4.55 ± 0.24 , respectivamente) y menor longitud de brotes (1.14 ± 0.07 y 0.82 ± 0.6 , respectivamente) (Figura 6). No se presentó contaminación en los tratamientos con 50, 100 y 200 mg L^{-1} AgNPs. La mayor contaminación ocurrió cuando no se aplicaron AgNPs, con 16.66% seguido por la dosis de 25 mg L^{-1} de NPsAg, con 8.33%.

Cuadro 4. Efecto de las AgNPs sobre el porcentaje de contaminación, multiplicación y longitud de los brotes de vainilla (*V. planifolia*) utilizando un SIT (RITA[®]).

Concentración de AgNPs (mg L^{-1})	Contaminación (%)	No. de brotes/ explante	Longitud del brote (cm)
0	16.66 ± 8.3^a	9.25 ± 0.36^b	2.15 ± 0.12^b
25	8.33 ± 8.3^b	14.33 ± 0.39^a	4.42 ± 0.12^a
50	0 ± 0.00^c	14.89 ± 0.40^a	4.71 ± 0.23^a
100	0 ± 0.00^c	8.29 ± 0.35^b	1.14 ± 0.07^c
200	0 ± 0.00^c	4.55 ± 0.24^c	0.82 ± 0.6^c

*Los valores representan la media \pm EE (Error Estándar). Medias con diferente letra dentro de la columna son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$), a los 30 días de cultivo *in vitro*.

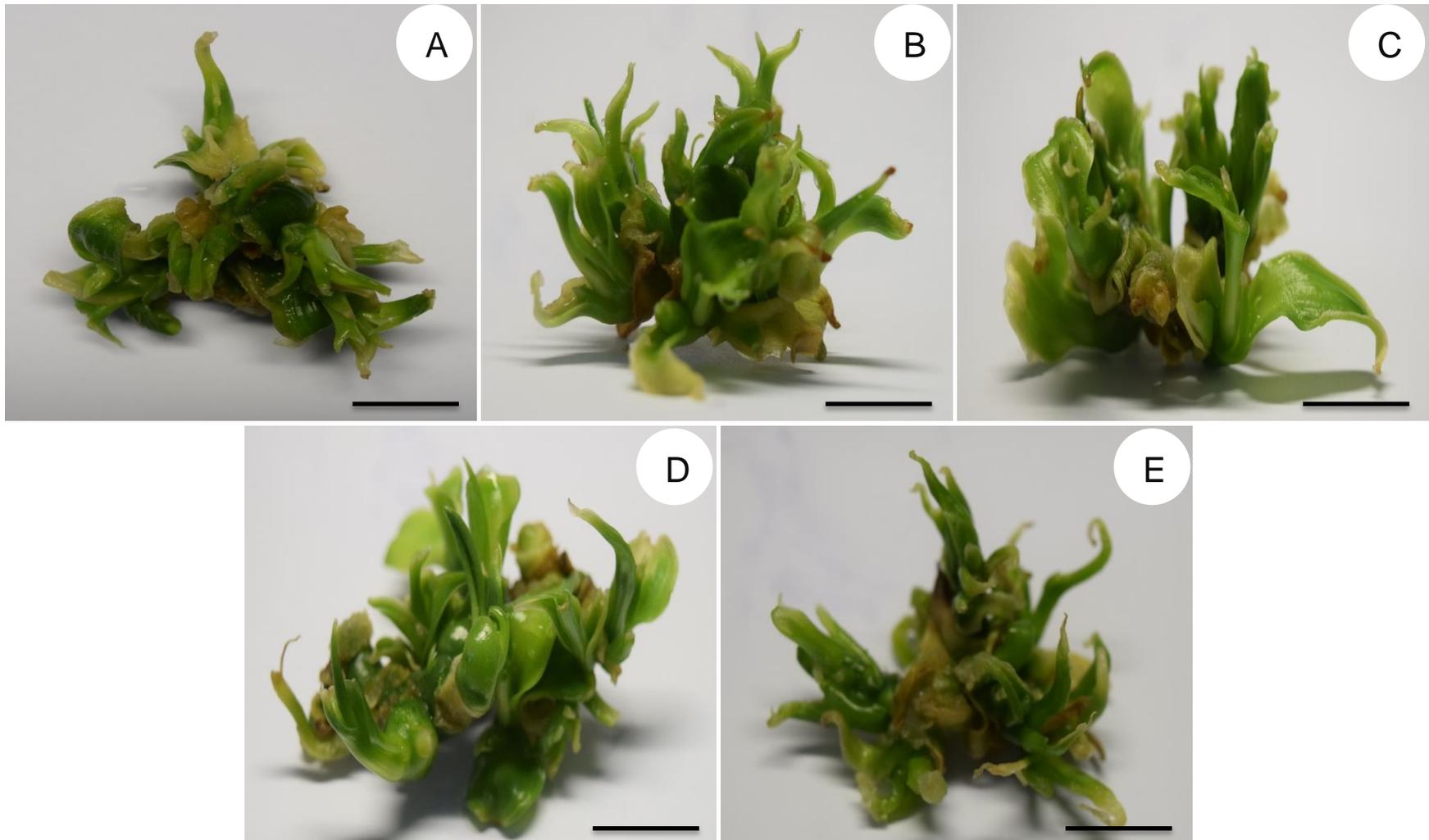


Figura 6. Efecto de las AgNPs sobre la proliferación de brotes de vainilla (*V. planifolia*) utilizando un SIT (RITA[®]) a los 30 días de cultivo *in vitro*. **A-E:** 0, 25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹ de AgNPs, respectivamente. Barra=2 cm.

Los resultados coinciden con lo reportado por Mahna *et al.*, (2013), en semillas de *Arabidopsis*, quienes usando 100 mg L^{-1} de AgNPs, observaron un efecto antimicrobiano en el medio de cultivo sin afectarse el porcentaje de germinación. Arab *et al.*, (2014), reportaron que concentraciones de 100 y 150 mg L^{-1} de AgNPs en segmentos nodales de G X N15 (híbrido de almond X peach) en inmersión y añadido directamente al medio de cultivo reducen significativamente la contaminación, en comparación con el tratamiento sin AgNPs. Moradpour *et al.*, (2016), reportaron que 10 mg L^{-1} de AgNPs en un tiempo de inmersión de 20 min resultó eficaz para reducir la contaminación microbiana sin afectar la supervivencia de explantes de *Hevea brasiliensis*.

Diversas teorías proponen el posible mecanismo para la acción antimicrobiana de las AgNPs. Según Liao *et al.*, (1997) y (Arab *et al.*, 2014), las AgNPs interactúan con las proteínas que contienen azufre causando irrupción en la membrana celular microbiana. Rai *et al.*, (2009) y (Sarsar *et al.*, 2014), propusieron que las AgNPs poseen un área de superficie extremadamente grande para un mejor contacto con las bacterias. Estas AgNPs se vinculan a la membrana celular y penetran fácilmente en el interior de las bacterias provocando lisis celular y muerte.

Las concentraciones de AgNPs aplicadas en este estudio mostraron diferencias significativas en la multiplicación de brotes y elongación. Los tratamientos de 25 y 50 mg L^{-1} de AgNPs mostraron un aumento en el número de brotes y longitud, mientras que las concentraciones más altas ($<100 \text{ mg L}^{-1}$ de AgNPs) inhibieron ambos procesos.

El hecho de que las dosis bajas de AgNPs tienen un efecto favorable sobre el desarrollo de la planta se ha observado anteriormente, por ejemplo, Najafi y Jamei *et al.*, (2014), reportaron que a dosis de 50 mg L^{-1} de AgNPs (no se reportó nm de diámetro de las AgNPs y se utilizó extracto de la raíz como agente estabilizador) aumentó el contenido de

clorofila total, clorofila a, clorofila b, peso fresco y la longitud de raíz en plantas de *Vigna radiata*. Las AgNPs son beneficiosas para la germinación de las semillas y el crecimiento de *Glycine max* (Lu *et al.*, 2002), y actúan como estimuladores de crecimiento (Sharon *et al.*, 2010).

El efecto inhibitorio de AgNPs en las plantas a altas concentraciones (>100 mg L⁻¹ de AgNPs) se ha reportado por Kumari *et al.*, (2009) informaron que AgNPs a 100 mg L⁻¹ con diámetro <100 nm y citrato como estabilizador, (proporcionado por Sigma-Aldrich, St. Louis MO EE.UU.) disminuyeron el índice mitótico (27.62 %) y causan múltiples roturas cromosómicas y la desintegración celular en *Allium cepa*. Stampoulis *et al.*, (2009), demostraron que AgNPs >100 mg L⁻¹ con diámetro <100 nm y citrato como estabilizador, (proporcionado por Sigma-Aldrich, St. Louis MO EE.UU.) inhibieron la germinación de semillas, crecimiento y volumen de transpiración de las plantas de zucchini. Lee *et al.*, (2012), demostraron que el crecimiento de raíces de *Phaseolus radiatus* y *Sorghum bicolor* es inhibido por 13 y 26 mg L⁻¹ de AgNPs con diámetro de 5 a 25 nm (promedio de 10 nm) y citrato como estabilizador, (proporcionado por ABC nanotecnología, Daejeon, KOR).

En *Arabidopsis thaliana*, Geisler-Lee *et al.*, (2013), demostraron que 535 mg L⁻¹ de AgNPs con diámetros de 20, 40 y 80 nm y citrato y fosfato como estabilizadores, (De Ted Pella Inc. Redding, CA, EE.UU.) inhibieron las plántulas y el alargamiento de la raíz. Nair y Chung (2014^{a,b}) mostrarán un aumento en la peroxidación lipídica y la producción de ROS en los tejidos vegetales, así como la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo en dosis de 400, y 500 mg L⁻¹ de CuONPs.

También se ha observado que AgNPs con diámetro de 5 a 25 nm (promedio 10 nm) y citrato como estabilizador, (proporcionado por ABC Nanotech Daejeon, KOR) redujeron el crecimiento de *Phaseolus radiatus* y *Sorghum bicolor* cultivados en suelo y agar como medio de cultivo (Lee *et al.*, 2012). Amooaghaie *et al.*, (2015), demostraron que AgNPs a 100

mg L⁻¹ con diámetro de 40 nm y tipo de estabilizador no mencionado, (De Shanghai Co. LTD Huzheng Nanotecnología AGS-WMB1000C, Shanghai, CHN) redujeron la germinación en *Brassica nigra*. Del mismo modo, Gubbins *et al.*, (2011), informaron que AgNPs a 160 mg L⁻¹ con diámetro de 29,2±10,9 nm y 93,52±48,6 nm y citrato como estabilizador podrían inhibir el crecimiento de *Lemna minor*. AgNPs a 100, 125 y 150 mg L⁻¹ con diámetro de 10 a 20 nm y citrato como estabilizador en medio MS tienen efectos inhibidores sobre el crecimiento de las plántulas de trigo (Razzaq *et al.*, 2016). Homae y Ehsanpour (2015), en *Solanum tuberosum* informaron que 2 mg L⁻¹ de AgNPs con diámetro de 20 nm y polivinilpirrolidona (PVP) como estabilizador, (US Investigación nanomateriales, Inc. Houston, TX EE.UU.) mejoraron parámetros de crecimiento tales como peso seco, longitud de la raíz y el área foliar. Sin embargo, las AgNPs mostraron toxicidad a los 10 y 20 mg L⁻¹ de concentración.

Diferentes hipótesis podrían explicar el aumento en el número de brotes y longitud, la primera esta relacionada con el aumento en la acumulación de nutrientes. La segunda hipótesis, propuesta por Yin *et al.*, (2012), sugiere que el daño inducido por AgNPs puede causar la pérdida de gravitropismo en las raíces a través de la interrupción del transporte de auxinas. Uno de los efectos de las auxinas está relacionado con la dominancia apical, en el que la pérdida de la dominancia apical favorece el desarrollo de nuevos brotes (Acosta-Echeverría *et al.*, 2013).

6.2 Determinación de la acumulación de macro y micronutrientes

Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el contenido de macro y micronutrientes en los tratamientos de AgNPs (Cuadro 5). El N y Mg se acumularon en cantidades más altas cuando las plantas fueron expuestas a 50, 100 y 200 mg L⁻¹ de AgNPs. K y Ca no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos.

Cuadro 5. Efecto de las AgNPs sobre la absorción de macro y micro nutrientes en ápices de vainilla (*V. planifolia*) en medio MS semisólido.

AgNPs (mg L ⁻¹)	MACRONUTRIENTES (% de peso seco)					MICRONUTRIENTES (mg/kg)				
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	B
0	1.58±0.21 ^b	0.05±0.00 ^a	1.09±0.49 ^a	0.56±0.06 ^a	0.16±0.00 ^b	134.07±8.12 ^a	20.75±0.14 ^a	71.29±14.67 ^a	156.04±11.52 ^a	14.24±3.60 ^a
25	1.63±0.21 ^b	0.05±0.01 ^a	0.82±0.32 ^a	0.45±0.08 ^a	0.17±0.00 ^b	82.86±1.23 ^b	13.30±0.21 ^b	48.60±11.95 ^a	131.91±14.72 ^a	28.78±13.26 ^a
50	5.20±0.05 ^a	0.05±0.01 ^a	0.71±0.28 ^a	0.57±0.07 ^a	0.19±0.01 ^a	84.41±2.54 ^b	12.88±0.03 ^b	43.29±13.34 ^a	140.18±26.38 ^a	28.52±13.53 ^a
100	5.72±0.12 ^a	0.05±0.00 ^a	0.73±0.24 ^a	0.53±0.08 ^a	0.19±0.02 ^a	78.95±2.28 ^{bc}	12.75±0.72 ^b	51.54±16.51 ^a	114.03±12.20 ^a	36.18±18.73 ^a
200	5.73±0.09 ^a	0.07±0.00 ^a	0.71±0.26 ^a	0.41±0.04 ^a	0.19±0.00 ^a	61.06±5.16 ^c	12.49±0.68 ^b	50.21±14.63 ^a	127.56±14.71 ^a	30.73±15.18 ^a

*Los valores representan la media ± EE (Error Estándar). Medias con diferente letra dentro de la columna son significativamente diferentes (Tukey, p ≤0.05), a los 45 días de cultivo *in vitro*.

Se encontró una disminución en el contenido de Fe y Cu cuando los brotes fueron tratados con AgNPs. Las concentraciones de Zn, Mn y B no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos. Los brotes de vainilla cultivados en medios de cultivo con AgNPs acumulan una mayor cantidad de N y Mg, en comparación con el tratamiento control.

El nitrógeno es un componente de muchas moléculas importantes, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos, ciertas hormonas (por ejemplo, indol-3-acético; citoquinina), y clorofila (Hopkins y Huner, 2004). La mayor proporción de Mg se encuentra en la fracción de porfirina de la molécula de clorofila, pero también se requiere para estabilizar la estructura de ribosoma y está implicado como un activador para numerosas enzimas. El magnesio es crítico para las reacciones que implican ATP, donde actúa para enlazar la molécula de ATP al sitio activo de la enzima. El Mg es también un activador para carboxilasa ribulosa-bisfosfato y fosfoenolpiruvato carboxilasa, dos enzimas críticas en la fijación de carbono fotosintético (Hopkins y Huner, 2004).

Por otro lado, el Fe está relacionado con dos funciones importantes en la planta, que es parte del grupo catalítico para muchas enzimas redox y se requiere para la síntesis de clorofila. El Fe es también un componente de varias enzimas oxidasas, tales como la catalasa y la peroxidasa (Hopkins y Huner, 2004). Juntos, N, Mg y Fe están asociados a la biosíntesis de la clorofila, molécula vital para la fotosíntesis durante el desarrollo. Hierro y Cu fueron los únicos micronutrientes con una reducción en los brotes causados por el tratamiento con AgNPs. El cobre (Cu) es un micronutriente esencial que se requiere para el crecimiento y desarrollo de plantas normales (Li *et al.*, 2015). Es un componente vital implicado en diversos procesos, incluyendo las reacciones de transferencia de electrones de la respiración y la fotosíntesis o la eliminación de los radicales superóxido (Adrees *et al.*, 2015).

A nivel celular, el Cu juega un papel importante en la señalización de la transcripción, maquinaria tráfico de proteínas, fosforilación oxidativa, y la movilización de hierro, (Da Costa y Sharma, 2016). Esto podría explicar por qué las plantas tuvieron un menor crecimiento a altas concentraciones de AgNPs, las AgNPs podrían bloquear el transporte de nutrientes por competencia de los transportadores iónicos. A la fecha, no hay suficiente información para formar una idea clara de como las AgNPs podrían afectar a la captación de macro y microelementos. Zuverza-Mena *et al.*, (2016) sugieren que es posible que las AgNPs bloquean físicamente la vía de difusión o los canales para la absorción activa.

Los brotes obtenidos en este experimento no mostraron diferencias significativas en el contenido de P, K, Ca, Zn y Mn. Esto puede ser debido a la inmovilización de los macro y micronutrientes en los medios de cultivo o, alternativamente, son menos requeridos durante el metabolismo estrés. Martínez-Fernández *et al.*, (2016), en *Helianthus annuus* en cultivo hidropónico, encontraron que la aplicación de 100 mg L⁻¹ de nanopartículas de óxido de hierro redujo las concentraciones de los macronutrientes Ca, K, Mg y S en comparación con las plantas del tratamiento control. Jhanzab *et al.*, (2015), en *Triticum aestivum* a diferentes concentraciones de AgNPs, encontraron que 25 mg L⁻¹ AgNPs mejora de forma significativa los atributos de crecimiento y rendimiento, la absorción de N, P y K y la eficiencia en el uso de nutrientes, mientras que la concentración de 75 mg L⁻¹ resultó en una disminución en el rendimiento de grano.

Por lo tanto, los efectos positivos y negativos en la multiplicación y acumulación de macro y micronutrientes dependen de la especie vegetal y de las características fisicoquímicas de las AgNPs empleadas en las diferentes fases de la micropropagación. En particular las AgNPs de Argovit™ a bajas concentraciones no afecta la acumulación de la mayoría de los nutrientes, excepto Cu y Fe.

6.3 Evaluación del estrés oxidativo

Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el contenido de Compuestos Fenólicos Totales (TPC), Capacidad Antioxidante (ORAC), Especies Reactivas a Oxígeno (ROS) y Peroxidación Lipídica (LP-MDA) en brotes de vainilla obtenidos en los diferentes tratamientos con AgNPs (Cuadro 6). Brotes de vainilla cultivados en medio con 25 y 50 mg L⁻¹ de AgNPs tuvieron un aumento significativo en el contenido de TPC. El más alto ORAC se produjo en el tratamiento de 50 mg L⁻¹ de AgNPs, seguido de 25 mg L⁻¹, mientras que el más bajo se produjo en el tratamiento con concentraciones de 200 mg L⁻¹ de AgNPs. Para ROS y la generación de LP-MDA, los resultados muestran que ambos indicadores aumentaron significativamente cuando la concentración AgNPs en el medio de cultivo aumentó. Los valores más altos de estos indicadores se observaron a concentraciones de 100 y 200 mg L⁻¹ de AgNPs.

Rani *et al.*, (2016), en *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms, observaron un aumento cuantitativo en el contenido de fenoles totales en el tratamiento con 10 mg L⁻¹ de AgNPs con diámetro de <100 nm y polivinilpirrolidona (PVP) como estabilizador, (proporcionado por Sigma-Aldrich, St. Louis MO EE.UU.) y observaron un aumento de la actividad de la enzima SOD en las plantas tratadas con una concentración <10 mg L⁻¹ de AgNPs. Según Yasur y Rani (2013), las AgNPs pueden generar ROS y la planta revierte este efecto mediante el aumento de la producción de compuestos fenólicos con alta actividad antioxidante. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los brotes de vainilla son capaces de aumentar su producción de compuestos fenólicos para tratar de contrarrestar la producción de ROS producido por AgNPs hasta la dosis de 50 mg L⁻¹. Sin embargo, se observó que a altas concentraciones de AgNPs (100 y 200 mg L⁻¹), el contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante disminuyó significativamente, mientras que la producción de ROS aumentó.

Cuadro 6. Efecto de las AgNPs sobre la formación de Compuestos Fenólicos Totales, Capacidad Antioxidante, Especies Reactivas a Oxígeno y Peroxidación de Lípidos en vainilla (*V. planifolia*) en medio MS semisólido.

AgNPs ¹ (mg L ⁻¹)	TPC ² (mg GAE g ⁻¹ DW*)	ORAC ³ (mmol TE g ⁻¹ DW*)	ROS ⁴ (MFI)	LP-MDA ⁴ (nmol g ⁻¹ DW*)
0	83.52±0.91 ^b	1595±15.83 ^d	0.126±0.01 ^a	348.00±09.98 ^a
25	153.87±1.21 ^a	2367.44±26.15 ^b	0.125±0.07 ^a	351.23±09.63 ^a
50	154.03±1.72 ^a	2588.12±31.77 ^a	0.637±0.09 ^b	412.51±13.32 ^b
100	97.49±1.12 ^{ab}	1872.42±19.23 ^c	0.832±0.16 ^c	709.31±19.27 ^c
200	53.79±0.74 ^c	1321.21±15.13 ^e	0.921±0.19 ^{cd}	933.67±21.31 ^d

¹ Concentración de AgNPs en Medio de cultivo MS semisólido, cuantificado en miligramos por litro de medio de cultivo MS (mg L⁻¹). ² Compuestos Fenólicos Totales, expresado como miligramos de Acido Galico Equivalentes por gramo (mg GAE g⁻¹). ³ Capacidad Antioxidante, cuantificado por Capacidad de Absorbancia del Radical Oxígeno (ORAC) expresado como Equivalentes Trolox por gramo (TE g⁻¹). ⁴ Especies Reactivas a Oxígeno cuantificado por ensayo de Peroxido de Hidrogeno, expresado como Intensidad Media de Fluorescencia (MFI). ⁵ Peroxidación Lipídica cuantificado por ensayo de Malondialdehído (MDA), expresado como nanomol por gramo (nmol g⁻¹). DW, peso seco. Los valores representan la media±EE (Error Estándar). Medias con diferente letra dentro de la columna son significativamente diferentes (Tukey, p ≤0.05), a los 45 días de cultivo *in vitro*.

Estos resultados demuestran que las AgNPs en altas concentraciones (>50 mg L⁻¹) inhiben la producción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, favoreciendo de este modo el aumento de ROS, las concentraciones de 25 y 50 mg L⁻¹ son las adecuadas para utilizar en la multiplicación debido a que la planta tiene la capacidad de compensar el estrés generado con la generación de compuesto fenólicos. Según López-Moreno *et al.*, (2016), informaron que un aumento de ROS en el interior de las membranas celulares se debe a factores ambientales que inducen estrés a la planta. Los metales pesados aumentan ROS dentro de las membranas celulares provocando daños considerables e interrumpen la actividad normal de las células de las plantas.

Esta respuesta se puede atribuir a la acumulación de AgNPs en tejidos de plantas que podrían inducir una respuesta de estrés oxidativo. Este hecho probablemente causa una disminución en el número y longitud de brotes, debido a que una mayor concentración de especies reactivas del oxígeno induce la apoptosis. Este efecto también tiene un impacto en la apariencia macroscópica de tejido de la hoja, como se muestra en la Figura 6.

En *Solanum tuberosum*, Homae y Ehsanpour (2015), encontraron que la aplicación de 2 mg L⁻¹ de AgNPs con diámetro de 20 nm y polivinilpirrolidona (PVP) como estabilizador, (US Investigación Nanomateriales, Inc. Houston, TX EE.UU.) disminuye longitud de brotes. Los síntomas más prominentes de la generación de estrés oxidativo en la membrana biológica se puede observar debido a la peroxidación de los lípidos (Rajeshwari *et al.*, 2016). Por lo tanto, los ácidos grasos pueden seguir convirtiéndose en peróxidos de lípidos tóxicos por el radical hidroperoxilo, y de este modo, destruir las membranas biológicas (Kumari *et al.*, 2011). En este estudio la peroxidación de lípidos aumentó significativamente cuando se eleva la concentración AgNPs, lo que indica que la producción de ROS causado por AgNPs es capaz de aumentar la peroxidación lipídica. La planta contrarresta este efecto mediante la inducción de la producción de compuestos fenólicos; sin embargo, a altas concentraciones de AgNPs (100 y 200 mg L⁻¹), la producción de ROS es tan alta que es probable que desestabiliza la membrana celular y causa la muerte celular, inhibiendo el crecimiento. En un estudio realizado por Nair, (2015), sobre la germinación de *Vigna radiata* L. en la presencia de 20 y 50 mg L⁻¹ de AgNPs con tamaño de partículas de plata de 20 nm, citrato y fosfato como estabilizadores, (Ted Pella Inc. De Redding, CA, EE.UU.), demostró que cuanto mayor es la concentración de AgNPs en el medio de cultivo, mayor es la producción de ROS en los tejidos de la planta.

6.4 Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad de diferentes concentraciones de AgNPs

Los efectos de las AgNPs sobre el número de hojas, longitud del tallo, número de raíces y longitud de raíces durante la fase de elongación y enraizamiento se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Efecto de las AgNPs sobre la elongación y enraizamiento de vainilla (*V. planifolia*) en medio MS semisólido.

AgNPs (mg L ⁻¹)	Número de hojas	Longitud de tallo (cm)	Numero de raíces	Longitud de raíces (cm)
0	4.60±0.30 ^a	7.60±0.56 ^a	4.40±0.26 ^a	5.30±0.23 ^{ab}
25	3.50±0.22 ^{ab}	7.80±0.64 ^a	3.90±0.37 ^{ab}	5.10±0.14 ^{ab}
50	3.90±0.27 ^{ab}	6.60±0.56 ^{ab}	3.80±0.32 ^{ab}	5.77±0.19 ^a
100	3.30±0.33 ^{ab}	5.90±0.34 ^{ab}	2.90±0.23 ^b	4.89±0.19 ^b
200	3.00±0.47 ^b	5.30±0.26 ^b	2.70±0.33 ^b	3.67±0.28 ^c

*Los valores representan la media±EE (Error Estándar). Medias con diferente letra dentro de la columna son significativamente diferentes (Tukey, p ≤0.05), a los 45 días de cultivo *in vitro*.

Las AgNPs mostraron una disminución significativa en el número de hojas (3.00±0.47), longitud de tallo (5.30±0.26), número de raíces (2.70±0.33) y longitud de raíces (3.67±0.28) para la dosis de 200 mg L⁻¹ de AgNPs seguido de 100, 50 y 25 mg L⁻¹ de AgNPs, un aumento significativo en la longitud de raíces se registro en la dosis de 50 mg L⁻¹(Figura 7).

Las AgNPs inducen cambios significativos a nivel fisiológico y molecular afectando el crecimiento de las plantas (Razzaq *et al.*, 2016). De acuerdo con lo reportado por Krishnaraj *et al.*, (2012), en *Bacopa monnieri* las AgNPs no tuvieron efectos tóxicos graves en bajas concentraciones y promovieron el crecimiento en la germinación. Najafi y Jamei, (2014), en *Vigna radiata* encontraron un aumento significativo en el peso fresco de

los brotes, altura de la planta y peso fresco de la raíz en respuesta a 50 mg L⁻¹ de AgNPs.



Figura 7. Efecto de las AgNPs sobre ápices de vainilla (*V. planifolia*) en medio MS semisólido a los 45 días de cultivo *in vitro*. Dosis de izquierda a derecha 0, 25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹ de AgNPs. Barra= 2 cm.

Un efecto desfavorable de las AgNPs en el crecimiento en medio MS podría ser debido a una menor disponibilidad de algunos nutrientes, como fue descrito en el análisis nutricional. En concentraciones altas de nanopartículas metálicas hay mayor acumulación en raíces y brotes (Adhikari et al., 2013), dando lugar a efectos tóxicos inducidos por estrés (Atha et al., 2012). Las AgNPs redujeron el peso seco de la planta de arroz según lo reportado por Mirzajani et al., (2013). Se ha reportado por (Lee et al., 2012; Yin et al., 2011), respectivamente, una disminución en el crecimiento de las raíces de *Phaseolous radiatus* y *Sorghum bicolor* cuando las plantas fueron expuestas a 40 mg L⁻¹ de AgNPs con tamaño

de partícula de 5-25 nm y citrato como estabilizador, (provisto por ABC Nanotech Daejeon, KOR), también una disminución en la longitud de la raíz y biomasa de *Lolium multiflorum* cuando se exponen a 40 mg L⁻¹ de AgNPs con tamaño de partícula de 6-25 nm y goma arábiga como estabilizador. Otros estudios han reportado efectos inhibitorios de las AgNPs a concentraciones que van desde 0.2-10 mg L⁻¹ con diámetro de 6-10 nm y citrato y goma arábiga como estabilizadores, (proveedor Shanghai Huzheng Nanotechnology Co., Ltd. AGS-WMB1000C, CHN) (Jiang *et al.*, 2012; Qian *et al.*, 2013).

En la presente investigación, también estudiamos el efecto citotóxico y genotóxico de las AgNPs sobre los meristemos apicales de las raíces de *V. planifolia* utilizando el Índice Mitótico (IM), Aberraciones Cromosomales (AC) y la inducción de micronúcleos (Mn) como criterios de evaluación toxicológicos. El IM fue utilizado para determinar el porcentaje de división celular. Se observó que el IM disminuyó significativamente cuando incrementaron las concentraciones de AgNPs, el mayor porcentaje de IM (88.21±0.48%) se registro en 0 mg L⁻¹ de AgNPs seguido de (81.52±1.06% y 77.15±1.28%) para 25 y 50 mg L⁻¹ de AgNPs, respectivamente. El menor porcentaje de IM (33.53±1.91%) se registro en 200 mg L⁻¹ de AgNPs (Cuadro 8). Una evaluación cuantitativa de la distribución de estas aberraciones demostró significativamente que los micronúcleos son mas frecuentes a 200 mg L⁻¹ de AgNPs. Por lo tanto, la frecuencia de micronúcleos fue dependiente de la concentración. El porcentaje de AC aumentó significativamente cuando se incremento la concentración de AgNPs. Porcentajes bajos de AC (0.03±0.0%, 0.18±0.06%) para 0, 25, mg L⁻¹ de AgNPs, respectivamente y el mayor (6.90±0.22%) para 200 mg L⁻¹ de AgNPs (Cuadro 8). El análisis de la metafase en los meristemos apicales de las raíces de *V. planifolia* reveló diferentes tipos de ACs, las cuales consistieron en fragmentos cromosomales, células con puentes, células binucleadas, y micronúcleos (Figura 8).

Cuadro 8. Efecto de las AgNPs sobre el Índice Mitótico (IM%) y Aberraciones Cromosomales (AC%) en meristemos apicales de raíz de vainilla (*V. planifolia*) en medio MS semisólido.

AgNPs (mg L ⁻¹)	IM (%)	Aberraciones Cromosomales (AC)				Total
		Células con Puente	Fragmentos cromosomales	Células binucleadas (BN)	Micronúcleos (Mn)	
0	88.21±0.48 ^a	0.03	0	0	0	0.03±0.0 ^d
25	81.52±1.06 ^b	0.10	0.08	0	0	0.18±0.06 ^d
50	77.15±1.28 ^b	0.30	0.50	0.17	0	0.97±0.03 ^c
100	60.35±0.90 ^c	1.5	1.0	0.16	1.5	4.16±0.17 ^b
200	33.53±1.91 ^d	1.5	1.4	1.0	3.0	6.90±0.22 ^a

*Los valores representan la media ± EE (Error Estándar). Medias con diferente letra dentro de la columna son significativamente diferentes (Tukey, p ≤0.05), a los 45 días de cultivo *in vitro*. n=3000.

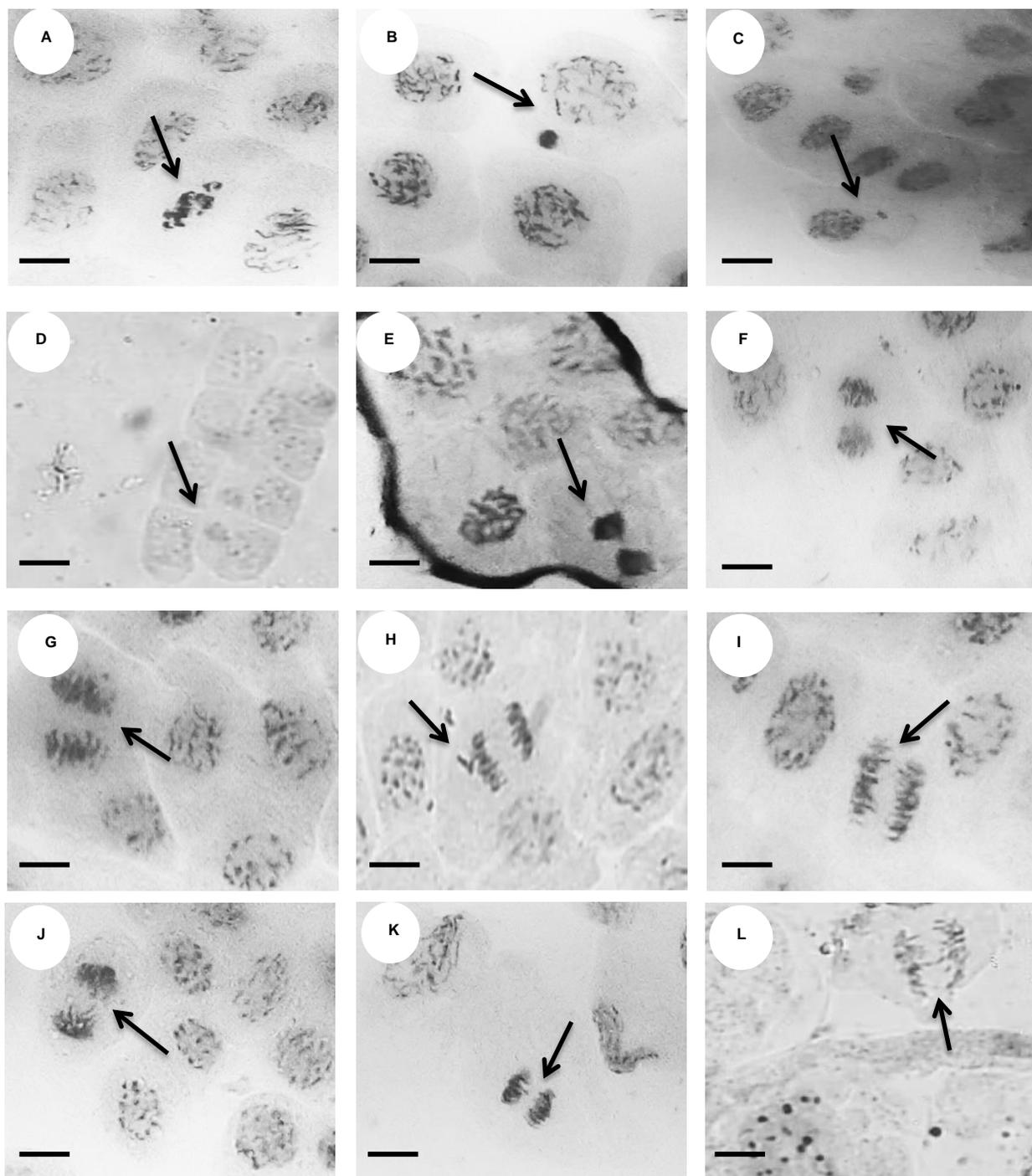


Figura 8. Aberraciones cromosomales y nucleares observadas en células del meristemo apical de la raíz de vainilla (*V. planifolia*) en medio MS semisólido expuestas a dosis elevadas de AgNPs a los 45 días de cultivo. **A-D)** células con micronúcleo, **E-F)** célula binucleada, **G-I)** anafase con fragmento cromosomal, **J-K)** célula en telofase con laggard, **L)** célula en anafase con puente. Barra = 10 μ m.

Los resultados demuestran que la exposición de las raíces de *V. planifolia* a concentraciones elevadas (100 y 200 mg L⁻¹) de AgNPs causa citotoxicidad y genotoxicidad. Hubo una inhibición del Índice Mitótico (IM) dependiente de la concentración, el cual indica el potencial citotóxico de las AgNPs en *V. planifolia*. El IM representa el número de células en división y esto representa el crecimiento, por lo tanto, cualquier disminución en el IM conduce a la reducción del crecimiento (Patlolla *et al.*, 2012). Efectos similares sobre el IM son descritos por Kumari *et al.*, 2011 para nanopartículas de Oxído de Zinc (ZnONPs) en *Allium cepa*. El decremento de la actividad mitótica probablemente indica el efecto mitodepresivo de las AgNPs, esto puede interferir con el desarrollo normal de la mitosis, previniendo así a un número de células de iniciar la profase y bloquear el ciclo mitótico. Además, durante la interfase inhiben la síntesis de ADN/proteína (Elghamery *et al.*, 2000). La alta frecuencia de aberraciones cromosomales inducidas por las AgNPs tales como células con puente, fragmentos cromosomales, células binucleadas y micronúcleos reflejan principalmente sus efectos sobre el huso mitótico, alterando la orientación de los cromosomas en las diversas etapas del ciclo celular (Tanti *et al.*, 2012). Las células con micronúcleos (Mn) podrían haber sido el resultado del deterioro del huso y/o del cromosoma. El grupo de Tubulina-SH, que es el principal responsable de organizar la formación del huso podría ser el objetivo para el ion Ag⁺ o la unión de las AgNPs (Panda *et al.*, 2011).

Todavía no es claro como las AgNPs afectarán diferentes especies de plantas en términos de elongación y enraizamiento. Factores como tamaño, concentración y tipo de estabilizador usado; así como diferencias genéticas entre las especies pueden contribuir a resultados contrastantes. Sin embargo, comparar la elongación y el enraizamiento ofrece un acercamiento más amplio a la fitotoxicidad de las AgNPs. Se necesita de pruebas estandarizadas que puedan elucidar estos mecanismos.

6.5 Inducción de Hormésis por AgNPs en *V. planifolia*

Según Poschenrieder *et al.*, (2013), recomiendan que el término hormésis sea utilizado en la toxicología de plantas como un término descriptivo para la fase estimuladora en curvas de respuesta de crecimiento que es inducido por bajas concentraciones de iones metálicos tóxicos sin evidencia de mecanismos subyacentes. Los efectos positivos de la hormésis sugieren cambios metabólicos en las células y el organismo para adaptarse o prepararse para un daño de magnitud mayor posteriormente a las amenazas externas del entorno (Wiegant *et al.*, 2011; Stark, 2012). La hormésis se entiende cada vez más como una respuesta dinámica de adaptación o plasticidad biológica de un sistema vivo complejo a nivel de todo el organismo a un tipo de estrés leve y de diferentes categorías (Calabrese, 2013). Calabrese y Mattson (2011), han utilizado el término hormésis como una estimación cuantitativa de la plasticidad biológica debido a la adaptación a través de la activación de las defensas por señalización cruzada. Otros investigadores han propuesto que los organismos expuestos a destiempo de forma intermitente a estímulos horméticos podrían cambiar y dar forma a la expresión epigenética hacia una mayor capacidad de resistencia frente a factores de estrés de mayor intensidad, la enfermedad y su envejecimiento (Vaiserman, 2011; Stark, 2012).

Se ha afirmado que las bajas concentraciones de metales tóxicos inducen efectos horméticos a través de los mecanismos de defensa a estrés que las plantas activan (Poschenrieder *et al.*, 2013). Las paredes celulares vegetales funcionan como tamices naturales, y las AgNPs tienen que penetrar las paredes celulares y membranas plasmáticas de las capas de la epidermis en las raíces para entrar en los tejidos vasculares (xilema) con el fin de ser captadas y translocadas a través de los tallos de las hojas (Dietz y Herth, 2011).

El tamaño de poro de las paredes celulares de las plantas esta generalmente en el rango de unos pocos nanómetros (Carpita *et al.*, 1979). Esto puede explicar en parte por qué las AgNPs con tamaño de 35 ± 15 nm tienen efectos sobre las variables evaluadas. Se sabe que el tamaño y la forma de las nanopartículas metálicas influyen en su química, y propiedades térmicas y ópticas (El- Sayed, 2001). Por lo tanto, el tamaño y otras características importantes también podrían modificar las propiedades biológicas de las nanopartículas. En este estudio, las AgNPs tuvieron efecto sobre el desarrollo, la acumulación de nutrientes, el contenido de antioxidantes y la generación de ROS. Los resultados muestran una relación entre el número de brotes y longitud con actividad antioxidante promovida por la aplicación de diferentes concentraciones de AgNPs. Por lo tanto, el efecto observado en la fase de multiplicación de brotes como respuesta hormética puede explicarse por el siguiente mecanismo: el aumento de la producción y longitud de brotes a 50 mg L^{-1} de AgNPs es probablemente debido a la acumulación de N y Mg, una respuesta observada en todas las concentraciones evaluadas AgNPs. Además, a 50 y 100 mg L^{-1} de AgNPs, el estrés oxidativo aumentó, pero se compensa con la alta capacidad antioxidante, lo que resulta en la producción intensiva de brotes. Por último, a una concentración de 200 mg L^{-1} de AgNPs, el estrés oxidativo siguió aumentando mientras que la capacidad antioxidante se redujo, lo que lleva a la reducción en el número y longitud de brotes. Además, en este estudio la concentración de AgNPs, la polivinilpirrolidona (PVP) como estabilizador y la concentración de plata metálica (3.0 mg L^{-1} de concentración) son mencionados, lo que permitirá futuras comparaciones en las actividades biológicas por cada 1 mg de componente activo (plata metálica). La concentración de plata metálica puede cambiar drásticamente dependiendo del tipo de AgNPs. Por ejemplo, en nuestro caso la concentración de plata metálica representa sólo el 5% en peso, mientras que el contenido de PVP es 95 % en peso de la concentración total de AgNPs.

VII. CONCLUSIONES

- Este estudio mostró que la aplicación de 50 mg L⁻¹ de AgNPs (3,0 mg L⁻¹ concentración de plata metálica) redujo la contaminación con respuesta hormética en el crecimiento y la diferenciación.
- Las AgNPs tienen efecto sobre la acumulación de nutrientes, el metabolismo de los antioxidantes y la generación de ROS.
- El contenido de N y Mg en los brotes aumentó significativamente (de 300 y 118%, respectivamente) a partir de 50 mg L⁻¹ de AgNPs afectando positivamente la multiplicación, mientras que Fe y Cu disminuyeron considerablemente.
- El estrés oxidativo causado por los AgNPs aumentó la producción de ROS y la peroxidación lipídica. Como un mecanismo de respuesta, la capacidad antioxidante también se incrementó, hasta los 50 mg L⁻¹ de concentración. A partir de esta concentración de AgNPs, la capacidad antioxidante disminuye afectando negativamente el metabolismo y la multiplicación.
- Se demostraron los efectos citotóxicos y genotóxicos de las AgNPs en *V. planifolia* en las concentraciones de 100 a 200 mg L⁻¹. Debido al aumento de diferentes Aberraciones Cromosómicas y disminución en el Índice Mitótico afectando negativamente la etapa de elongación y enraizamiento.
- Este es el primer estudio sobre el efecto de AgNPs en la regeneración *in vitro* de una especie vegetal que se notifica la concentración de plata metálica de las AgNPs utilizadas. En base a los resultados obtenidos se recomienda utilizar hasta 50 mg L⁻¹ de AgNPs (Argovit™) en la micropropagación por sus efectos microbicidas y horméticos. Este trabajo abre amplias perspectivas para la aplicación de este tipo de AgNPs en Cultivo de Tejidos Vegetales.

VIII. LITERATURA CITADA

- Abdel-Azeem, E. A., and B.A. Elsayed. 2013. Phytotoxicity of silver nanoparticles on *Vicia faba* seedlings. NY. Sci. J. (6)12: 148-156.
- Abdi, G. R. H., M. Salehi, and M. Khosh-Khui. 2008. Acta Physiol. Plant. 30: 709–714.
- Adhikari, T., S. Kundu, A.K. Biswas, J.C. Tarafdar, and A.S. Rao. 2013. Effect of copper oxide nano particle on seed germination of selected crops. J. Agri. Sci. Technol. A 2: 815.
- Adrees, M, S. Ali., M. Rizwan., M. Ibrahim., F. Abbas., M. Farid., M. ZiaurRehman., M.K. Irshad., and S. A. Bharwana. 2015. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. Environ Sci Pollut Res. 22:8148-8162.
- Aitken-Christie, J., and H. E. Davies. 1988. Development of a semi-automated micropropagation system. Acta Hort. 230: 81-87.
- Aitken-Christie, J. 1991. Automation In: Debergh P.C., Zimmerman R.H. (eds.) Micropropagation, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 342-354.
- Aitken-Christie, J., and C. Jones. 1987. Towards automation: Radiata pine shoot hedges *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 8:185-196.
- Alidoust, D., and A. Isoda. 2013. Effect of gamma Fe₂O₃ nanoparticles on photosynthetic characteristic of soybean (*Glycine max* L. Merr.): foliar spray versus soil amendment. Acta Physiol Planta 35:3365–3375.
- Almutairi, Z. M., and A. Alharbi. 2015. Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. International scholarly and scientific research and innovation. 9(6): 551-555.
- Alvard, D., F. Cote, and C. Teisson. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation: effects of temporary immersion of explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32: 55–60.
- Amooaghaiea, R., F. Tabatabaiea, and A. M. Ahadia. 2015. Role of hematin and sodium nitroprusside in regulating Brassica nigra seed germination under nanosilver and silver nitrate stresses. Ecotox. Environ. Safe. 113:259-270.
- Anderson, W. C., and G. W. Meagher. 1977. Cost of propagating broccoli plants through tissue culture. Horticult. Sci. 12(6):543-544.
- Anjum, N. A., S. S. Gill., A. C. Duarte, E. Pereira, and I. Ahmad. Silver nanoparticles in soil-plant systems. J. Nanopart Res. 15:1896-7.
- AOAC, (Association of Official Analytical Chemist). 1990. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists. 15th Ed. Gaithersburg, USA: AOAC Press.

- Arab, M. M., A. Yadollahi, M. Hosseini-Mazinani, and S. Bagheri. 2014. Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on in vitro establishment of G x N15 (hybrid of almond x peach) rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 12:103-110.
- Arencibia, A. D., A. Bernal, L. Yang, L. Cortegaza, E. R. Carmona, A. Pérez, C. J. Hu, Y. R. Li, C. M. Zayas, and I. Santana 2008. New role of phenolpropanoid compounds during sugarcane micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Plant Sci.*175:487-496.
- Arruda, S.C.C., A.L.D. Silva., R. M. Galazzi., R. A. Azevedo., M. A. Z. Arruda. 2015. Nanoparticles applied to plant science: a review. *Talanta* 131, 693–705.
- Atha, D. H., H. Wang, E.J. Petersen, D. Cleveland, R.D. Holbrook, P. Jaruga, M. Dizdaroglu, B. Xing, and B.C. Nelson. 2012. Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models. *Environ. Sci. Technol.* 46:1819-1827.
- Attree, S. M., M. K. Pomery, and L. C. Fowke. 1994. Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce *Picea glauca* (Moench.) Voss. Synthetic seeds in a bioreactor. *Plant Cell Rep.* 13:601-606.
- Barrena, R., E. Casals, J. Colon, X. Font, A. Sanchez, and V. Puntès. 2009. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*. 75: 850-857.
- Battersby, N.S. 2000. The biodegradability and microbial toxicity testing of lubricants some recommendations. *Chemosphere*. 41: 1011-1027.
- Berthouly, M., and H. Etienne. 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In *Liquid Culture for in vitro Plant Propagation*. A.K. Hvoslef-Eide, W. Preil (eds). pp: 165-195.
- Borges, M., E. Estrada, I. Pérez, and S. Meneses. 2009. Uso de los diferentes tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Rev Colomb Biotecnol.* 10: 127-135.
- Bory, S., P. Lubinsky, A. M. Risterucci, J. L. Noyer, M. Grisoni, M. F. Duval, and P. Besse. 2008. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *Am J Bot.* 95: 805–815.
- Bryzgunov, V.S., V. N. Lipin, and V. R. Matrosov. 1964. Comparative evaluation of bactericidal properties of silver water and antibiotics on pure cultures of microbes and their associations / *Proc. Kazan Medical Institute, Kazan: Kazan Medical Institute.* 14: 121-122.
- Calabrese, E. J. 2013. Biphase dose responses in biology, toxicology and medicine: accounting for their generalizability and

- quantitative features. *Environ. Pollut.* 182: 452-460. Doi:10.1016/j.envpol.2013.07.046.
- Calabrese, E. J., and Mattson, M. P. 2011. Hormesis provides a generalized quantitative estimate of biological plasticity. *J. Cell Commun. Signal.* 5, 25-38. Doi:10.1007/s12079-011-0119-1.
- Calabrese EJ (2016) Preconditioning is hormesis part I: Documentation, dose-response features and mechanistic foundations. *Pharmacol. Res.* doi:10.1016/j.phrs.2015.12.021
- Carlson, C., S. M. Hussein, A. M. Schrand. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112(43):13608–13619.
- Carpita, N., D. Sabulase., D. Montezinos., and D. P. Delmer. 1979. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science.* 205:1144-1147. Doi:10.1126/science.205.4411.1144.
- Cassells, A.C. 1991. Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. in: P.C. Debergh, R.H. Zimmerman (Eds.). 31–44.
- Castellano, J. J., S. M. Shafii, F. Ko, G. Donate, T. E. Wright, R. J. Mannari, W. G. Payne, D. J. Smith, and M. C. Robson. 2007. *Int. Wound J.* 4:114–122.
- Chew, B.P., and J. S. Park. 2004. Carotenoid action on the immune response. *J Nutr.* 134:257–261.
- Choi, O., and Z. Hu. 2008. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ Sci Technol.* 42: 4583–4588.
- Chu, C. Y., S. L. Knight, and M. A. L. Smith. 1993. Effect of liquid culture on the growth and development of miniature rose (*Rosa chinensis* Jacq. 'Minima'). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 32:329-334.
- Clemedson, C., E. McFarlane-Abdulla, M. Andersson, F. Barile, M. Calleja, C. Chesne, R. Clothier, M. Cottin, R. Curren, and P. Dierickx. 1996. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part II. In vitro results from 68 toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals and a comparative cytotoxicity analysis. *Altern. Lab. Anim.* 24:273-310.
- Cornu, D., and M.F. Michel. 1987. *Acta Hortic.* 212: 83–86.
- Da Costa, M.V.J. and P.K. Sharma. 2016. Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oriza sativa*. *Photosynthetica.* 54(1): 110-119. Doi:10.1007/s11099-015-0167-5.
- Debergh, P.C., and L. J. Mane. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hortic.* 14:335-345.
- Desikan, R., M. K. Cheung, A. Clarke, S. Golding, M. Sagi, R. Fluhr, C. Rock, J. Hancock, and S. Neill. 2004. Hydrogen peroxide is a

- common signal for darkness and ABA-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Functional Plant Biology*. 31:913–920.
- Dhlamini, Z., C. Spilane, J. P. Mos, J. Ruane, N. Urquia, and A. Sonino. 2005. Status of research and application of plant biotechnologies in developing countries. Information Division, FAO. 65.
- Dietz, K. J., and S. Herth. 2011. Plant nanotoxicology. *Trends plant sci.* 16:582-589. Doi:10.1016/j.tplants.2011.08.003.
- Dimkpa, C.O., J. E. McLean., D. E. Latta., E. Manangón., D. W. Britt., W. P. Johnson., M. I. Boyanov, and A. J. Anderson. 2012a. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *J Nanopart Res* 14:1125.
- Ding, Y., and Q. Wu. 2005. Preparation of seed coating agent containing nano particles with low toxicity and high efficiency. Chinese Patent.
- Donnan, A. 1986. Determining and minimizing production costs. In: "Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. Zimmerman RH, Grierbach RJ, Hammerschlag FA, Lawson RH (eds.), Martinus Nijhoff Publishers, Boston. 163-173.
- Ducos, J.P., G. Labbe, C. Lambot, V. Earle E.D., and L. W. Langhans. 1975. Carnation propagation from shoot tip cultured in liquid medium. *Horticult. Sci.* 10: 608-610.
- Edhaya-Naveena, B., and S. Prakash. 2013. Biological synthesis of gold nanoparticles using marine algae *Gracilaria corticata* and its application as a potent antimicrobial and antioxidant agent. *Asian J Pharm Clin Res.* 6(2): 179–182.
- El-Sayed, M. A. 2001. Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Acc. Chem. Res.* 34, 257-264. Doi:10.1021/ar960016n.
- El-Temsah, Y. S., and E.J. Joner. 2012. Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. *Environ. Toxicol.* 27:42-49.
- Elumalai, M., C. Antunes, and J. Guilhermino. 2007. Enzymatic biomarkers in the crab *Carcinus maenas* from the Minho River estuary (NW Portugal) exposed to zinc and mercury. *Chemosphere.* 66: 1249–1255.
- Escalona, M., J. C. Lorenzo, B. Gonzalez, M. Danquita, Y. Desjardins and C. G. Barroto. 1999. Pineapple (*Ananas Comosus* L. Merr), micropropagation in temporary immersion system. *Plant Cell Reports.* 18:743-178.
- Etienne, H., and M. Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 69:215–231.

- Evans, H. J., and D. Scott. 1964. Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X-rays and maleic hydrazide in *Vicia faba*. *Genetics*. 49:17-38.
- Elghamery, A. A. A.I. Elnahas., and M.M. Mansour. 2000. The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cytologia* 55:209–215.
- Feng, S., X. Wang, G. Wei, P. Peng, Y. Yang, and Z. Cao. 2007. Leachates of municipal solid waste incineration bottom ash from Macao: heavy metal concentrations and genotoxicity. *Chemosphere*. 67:1133-1137.
- Foyer, C. H., and G. Noctor. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist*. 146: 359–388.
- Gamborg, O. L. 2002. Plant tissue culture: Biotechnology Milestones. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 38: 84-92.
- García-González, R., K. Quiroz, B. Carrasco and P. D. S. Caligari. 2010. Cultivo de tejidos de plantas: estado actual, oportunidades y desafíos. *Cien. Inv. Agr.* 37(3): 5-30.
- Geetha, S., and A. Sudheer. 2000. In vitro propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Curr Sci*. 79: 885–889.
- Geisler-Lee, J., Q. Wang, Y. Yao, W. Zhang, M. Geisler, and K. Li. 2013. Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology*. 7(3): 323-337.
- George, P. S., and G. A. Ravishankar. 1997. In vitro multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. *Plant Cell Rep* 16: 490–494.
- Georgiev, V., A. Schumann, A. Pavlov, and T. Bley. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in life sciences*. 14:607-621.
- Giorgetti, L., H. Talouizte, M. Merzouki, L. Caltavuturo, C. Geri, and S. Frassinetti. 2011. Genotoxicity evaluation of effluents from textile industries of the region FezBoulmane, Morocco: a case study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 2275-2283.
- Giridhar, P., and G. A. Ravishankar. 2004. Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. Under influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk. *Indian J Biotechnol.* 3:113–118.
- Grant, W.F., 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res-Fund. Mol. Mechan. Mutagen.* 3(10):175-185.
- Grant, W.F., 1999. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations: a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat. Res-Fund. Mol. Mechan. Mutagen.* 4(26):107-112.

- Gratao, P. L., A. Polle, P. J. Lea, and R. A. Azevedo. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plant a little easier. *Functional Plant Biology*. 32:481-494.
- Greil, J; Spies, T; Boswald, M; Bechert, T; Lugauer, S; Regenfus, A; Guggenbichler, JP. 1999. "Analysis of the acute cytotoxicity of the Erlanger silver catheter", *INFECTION*, 27:34-37.
- Greule, M., L. Tumino, T. Kronewald, U. Hener, J. Schleucher, A. Mosandl, and F. Keppler. 2010. Improved rapid authentication of vanillin using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ values. *Eur Food Res Technol*. 231:933–941.
- Gubbins, E. J., L. C. Batty, and J. R. Lead. 2011. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environmental Pollution*. 159: 1551-1559.
- Haider, A., and I. K. Kang. 2015. Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: a comprehensive review. *Adv Mat Sci Eng*.
- He, D., A. M. Jones, S. Garg, A. N. Pham, T. D. Waite. 2011. Silver nanoparticle reactive oxygen species interactions: application of a charging discharging model. *J Phys Chem C*. 115:5461-5468.
- Hernández, J. 2011. Paquete tecnológico Vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson). Establecimiento y mantenimiento. Programa Estratégico para el desarrollo Rural Sustentable de la Región Sur-Sureste: Trópico Húmedo. INIFAP. Tlapacoyan.
- Hopkins, W. G., and Huner, N. P. A. 2004. *Introduction to Plant Physiology*. New York: John Wiley and Sons. Inc.
- Huang, D., B.Ou, M. Hampsch-Woodill., J. A. Flanagan., and R. L. Prior. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem* 50:4437–4444.
- Huang, S., L. Wang, L. Liu, Y. Hou, and L. Li. Nanotechnology in agriculture, livestock, and aquaculture in China. 2015. A Review. *Agron. Sustain. Dev.* 35: 369-400.
- Huggett, R.J., R. A. Kimerle, P. M. Mehrle-Jr, H. L. Bergman. 1992. *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, Lewis Publishers, Chelsea, MI.
- Igamberdiev, A.U., and P. J. Lea. 2002. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organism. *Phytochemistry*. 60: 651–674.
- Ignatov, I., and O. Mosin. 2015. Microdispersed colloid silver nanoparticles in bionanotechnology. *Russian federation Nanotechnology research and practice*. 6(2):72-80.
- Iliev, I., A. Gajdošová, G. Libiaková, and S. M. Jain. 2010. Plant Micropropagation. In: Davey M.R., Anthony P. (eds). *Plant Cell Culture*. John Wiley and Sons. Ltd. Publications. pp. 1-24.

- Iqbal, M. 2016. *Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring: A Review. *Chemosphere*. 144: 785-802.
- Iqbal, M., and I. A. Bhatti. 2014. Re-utilization option of industrial wastewater treated by advanced oxidation process. *Pak. J. Agric. Sci.* 51:1141-1147.
- Iqbal, M., and J. Nisar. 2015. Cytotoxicity and mutagenicity evaluation of gamma radiation and hydrogen peroxide treated textile effluents using bioassays. *J. Environ. Chem. Eng.* 3:1912-1917.
- Iqbal, M., I. A. Bhatti, M. Zia-ur-Rehman, H. N. Bhatti, and M. Shahid. 2014. Efficiency of advanced oxidation processes for detoxification of industrial effluents. *Asian J. Chem.* 26:4291-4296.
- James, C. 2008. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. ISAAA Brief No. 39. ISAAA: Ithaca, NY. 243.
- Janarthanam, B., and S. Sheshadri. 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 44:84-89.
- Jhanzab, H. M., A. Razzaq., J. Ghulam., R. Ammara., H. Abdul and F. Yasmeen. 2015. Silver nano-particles enhance the growth, yield and nutrient use efficiency of wheat. *Int. J. Agron. Agri. Res.* 7:15-22.
- Jiang, H. S., M. Li, F.Y. Chang, W. Li, and L.Y. Yin. 2012. Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrhiza*, *Environ. Toxicol. Chem.* 31: 1880-1886.
- Kaegi, R., B. Sinnet, S. Zuleeg, H. Hagendorfer, E. Mueller, and R. Vonbank. 2010. Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environ. Pollut.* 158(9): 2900-2905.
- Kalimuthu, K., R. Senthilkumar, N. Murugalatha. 2006. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andrews. A tropical orchid. *Curr Sci.* 9:1401-1403.
- Kärkönen, A., and K. Kuchitsu. 2015. Reactive oxygen species in cell Wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry* 112: 22-32.
- Kathiresan, K., S. Manivannan, M. A. Nabeel, and B. Dhivya. 2009. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. *Colloids Surf B.* 71(1):133-137.
- Kaveh, R., Y. S. Li, S. Ranjbar, R. Tehrani, C. L. Brueck, and B. Van Aken. 2013. Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environ. Sci. Technol.* 47(18):10637-44.
- Kaviani, B. 2015. Some useful information about micropropagation. *Journal of Ornamental Plants.* 5(1):29-40.
- Keat, C. L., A. Aziz, A. M. Eid, and N. A. Elmarzugil. 2015. Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles. *Bioresources and Bioprocessing.* 2:47.

- Khosroushahi, A. Y., M. Valizadeh, A. Ghasempour, M. Khosrowshahli and H. Naghdibadi. 2006. Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxusbaccata*. *Cell BiolInt.* 30: 262-269.
- Kim, J. H., Y. Lee., E. J. Kim., S. Gu., E. J. Sohn., Y. S. Seo., H. J. An., and Y. S. Chang. 2014. Exposure of iron nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* enhances root elongation by triggering cell wall loosening. *EnvironSci Technol* 48:3477–3485.
- Kim, J.S., E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim, S. J. Park., and H. J. Lee. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol Biol Med.* 3: 95-101.
- Kjeldahl, J. Z. 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic bodies. *Analytical Chemistry*, 22, 366.
- Krishnaraj, C., G. Jagan, R. Ramachandran, S. M. Abirami, N. Mohan, and P. T. Kalaichelvan. 2012. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* L. Wettst. Plant growth metabolism. *Process Biochem.* 47:651-658.
- Kumar, A., K. Kaur and S. Sharma, 2013. Synthesis, characterization and antibacterial potential of silver nanoparticles by *Morus nigra* leaf extract. *Indian Journal of Pharmacology*, 1: 16-24.
- Kumari, M., A. Mukherjee, and N. Chandrasekaron. 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment.* 407: 5243-5246.
- Landsdown, A. B. 2010. Silver in healthcare: Its antimicrobial efficacy and safety in use / A.B. Landsdown, ed. – Cambridge: Royal Society of Chemistry. 217 p.
- Larue, C., J. Laurette., N. Herlin-Boime., H. Khodja., B. Fayard., A. M. Flank., F. Brisset., and M. Carriere 2012. Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): influence of diameter and crystal phase. *Sci Total Environ* 431:197–208.
- Lee, W. M., J.I. Kwak, and Y.J. An. 2012. Effect of silver nanoparticles in crop plants Phaseolus radiates and Sorghum bicolor; Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere.* 86: 492-499.
- Lee-Espinosa, H. E., J. Murguía-González, B. García-Rosas, A. L. Córdova-Contreras, A. Laguna-Cerda, J. O. Mijangos-Cortés, L. F. Barahona-Pérez, L. G. Iglesias-Andreu, and N. Santana-Buzzy. 2008. In vitro clonal propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *HortSci.* 43:454–458.
- Leme, D.M., and M. A. Marin-Morales. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat. Res-Rev. Mutat. Res.* 682: 71-81.
- Levin, R., and G. Tanny. 2004. Bioreactors as a low cost option for tissue culture. In: Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Conference proceedings. International Atomic Energy Agency, Vienna Austria. 47–54.

- Levin, R., and I. K. Vasil. 1989. An integrated and automated tissue culture system for mass propagation of plants. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 25: 21-27.
- Levin, R., R. Stav, Y. Alper, and A. A. watad. 1997. A technique for repeated axenic subculture of plant tissues in a bioreactor on liquid médium containing sucrose. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 3: 41-45.
- Li, S., G. Zhang., W. Gao., X. Zhao., C. Deng., and L. Lu. 2015. Plant growth, development and change in GSH level in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) exposed to copper and lead. *Arch Biol Sci Belgrade.* 67(2):385–396.
- Liau SY, Read DC, Pugh WJ, Furr JR, and Russell AD (1997). Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett. Appl. Microbiol* 25:279-283.
- Ma, X., J. Geisler-Lee., Y. Deng., and A. Kolmakov. 2010^a. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Sci Total Environ* 408: 3053–3061.
- Ma, Y., L. Kuang., X. He., W. Bai., Y. Ding., Z. Zhang., Y. Zhao., and Z. Chai. 2010. Effect of rare earth oxide nanoparticles on root elongation of plants. *Chemosphere.* 78: 273-279.
- Ma, T.H., Z. Xu, C. Xu, H. McConnell, E. V. Rabago, G. A. Arreola, and H. Zhang. 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat. Res.* 334: 185-195.
- Madhuri, S., S. Maheshwar, P. Sunil, and G. Oza. 2012. *Nanotechnology: concepts and applications*, vol 4. CRC Press, USA.
- Mahna, N., S. Z. Vahed, and S. Khani. 2013. Plant In vitro Culture goes Nano: Nanosilver-Mediated Decontamination of Ex vitro Explants. *J Nanomed Nanotechol.* 4: 161.
- Martínez-Fernández, D., M. Vítková., M. P. Bernal., and M. Komárek. 2015. Effects of nano-maghemite on trace element accumulation and drought response of *Helianthus annuus* L. in a contaminated mine soil. *Water Air Soil Pollut* 226(4):1–4.
- Martínez-Fernández, D., Barroso, D., and M. Komárek. 2016. Root water transport of *Helianthus annuus* L. under iron oxide nanoparticle exposure. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(2), 1732-1741. Doi: 10.1007/s11356-015-5423-5.
- Mehrotra, S., M. K. Goel, A. K. Kukreja, and B. N. Mishra. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology.* 6(13): 1484-92.
- Minno, D., and K. Nirmal. 2009. Micropropagation and in vitro conservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). In: Mohan J,

- Praveen K (eds) Protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants, Methods in Molecular Biology. Humana, New York, pp: 129-138.
- Mirzajani, F., H. Askari, S. Hamzelou, M. Farzaneh, and A. Ghassempour. 2013. Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf.* 88:48–54.
- Moradpour M, Aziz MA, Abdullah SNA (2016) Establishment of in vitro Culture of Rubber (*Hevea brasiliensis*) from Field-derived Explants: Effective Role of Silver Nanoparticles in Reducing Contamination and Browning. *J Nanomed Nanotechnol* 7: 375. doi:10.4172/2157-7439.1000375.
- Mongillo, F. J. 2007. *Nanotechnology* 101. Greenwood Press, Westport.
- Morones, J. R., J. L. Elechiguerra, A. Camacho, and J. T. Ramirez. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 16: 2346-53.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann Rev Plant Physiol.* 25: 135-166.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiologia Plantarum.* 15:473-497.
- Najafi, S., and R. Jamei. 2014. Effect of silver nanoparticles and $Pb(NO_3)_2$ on the yield and chemical composition of mung bean (*Vigna radiata*). *J. Stress Physiol. Biochem.* 10: 316-325.
- Neill, S. J., R. Desikan., A. Clarke., R. D. Hurst., and J. T. Hancock. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany.* 53: 1237-1247.
- Niemenak, N., K. Saare-Surminski, C. Rohsius, D. Omokolo, and R. Lieberei. 2008. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell Report.* 27: 667-676.
- Nowack, B. 2010. Nanosilver revisited downstream. *Science.* 330: 1054-1055.
- Nowack, B., and T. D. Bucheli. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 150, 5–22.
- Oukarroum, A., L. Barhoumi, L. Pirastru, and D. Dewez. 2013. Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. *Environ. Toxicol. Chem.* 32(4):902-7.
- Oviedo-Pereira, D., S. Alvarenga-Venutolo, S. Evangelista-Lozano, G. Sepulveda-Jimenez, and M. Rodriguez-Monroy. 2015. Micropropagacion de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un cultivo promisorio para México. *BioTecnología.* 9(2): 14-27.

- Paek, K. Y., D. Chakrabarty, and E. J. Hahn. 2005. Application of bioreactor systems for large production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell. Tissue. Organ Cult.* 81: 28-300.
- Paek, K. Y., E. J. Hahn, and S. H. Son. 2001. Application of Bioreactors for large-Scale Micropropagation Systems of Plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37: 149-157.
- Panda, K. K., V. M. M. Achary, R. Krishnaveni, B. K. Padhi, S. N. Sarangi, S. N. Sahu, and B. B. Panda. 2011. In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicol In Vitro.* 25: 1097-1105.
- Paque, M., J. Bercetche, and E. Dumas. 1992. Liquid media to improve and reduce the cost of *in vitro* conifer propagation. *Acta Horticult.* 319: 95-100.
- Park, H. J., S. H. Kim, S. J. Kim, and S. H. Choi. 2006. A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. *Plant Pathol J.* 22: 295–302.
- Parng, C. 2005. In vivo zebrafish assays for toxicity testing. *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* 8: 100-106.
- Parveen, A., and S. Rao. 2014. Effect of nanosilver on seed germination and seedling growth in *Pennisetum glaucum*. *J. Clust. Sci.*
- Patlolla, A. K., A. Berry, LB. May and P. B. Tchounwou. 2012. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia faba*: A pilot study in the environmental monitoring of nanoparticles. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 9: 1649-1662.
- Payet, B., A. S. C. Sing., and J. Smadja. 2006. Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7270–7276.
- Pérez, E., H. Ramírez, and N. Núñez-Ochoa. 1999. *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes (ed), Primera edición México. p 179.
- Perkin, E. 1996. Analytical method: atomic absorption spectroscopy. The Perkin Elmer corporation, Norwalk, USA. Robinson D.L.
- Pinaria, A. G., E. C. Liew, and L. W. Burgess. 2010. Fusarium species associated with vanilla stem rot in Indonesia. *Australas Plant Path.* 39: 176–183.
- Poschenrieder, C., C. Cabot., S. Martos., B. Gallego., and J. Barceló. 2013. Do toxic ions induce hormesis in plants?. *Plant Sci.* 212, 15-25. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.07.012.
- Pradhan, S., P. Patra., S. Das., S. Chandra., S. Mitra., K. K. Dey., S. Akbar., P. Palit., and A. Goswami. 2013. Photochemical modulation of biosafe manganese nanoparticles on *Vigna radiata*: a detailed molecular, biochemical, and biophysical study. *Environ Sci Technol* 47:13122–13131.

- Prieto-Garcia, F., M. A. Lechuga-Vargas, M. A. Mendez Marzo, E. Barrado Esteban, and J. C. Gaytan Oyarzun. 2006. Daños tóxicos en tejidos vegetales, producidos por aguas contaminadas con Arsenico en Zimapan, Hidalgo, México. *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas*. 26(1):94-97.
- Pulate, P. V., M. U. Ghurde, and V. R. Deshmukh. 2011. Cytological effects of the biological and chemical silver-nanoparticles in *Allium cepa* L. *International Journal of Innovations in Bio-Sciences*. 1:32-35.
- Qi, W. H., and M. P. Wang. 2004. Size and shape dependent melting temperature of metallic nanoparticles. *Mater Chem Phys*. 88: 280–284.
- Qian, H., X. Peng, X. Han, J. Ren, L. Sun, and Z. Fu. 2013. Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ion on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *J. Environ. Sci*. 25:1947-1955.
- Quardos, M.E., and L. C. Mar. 2010. Environmental and human health risks of aerosolized silver nano particles. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 60,770-781.
- Qureshi, K., M. Z. Ahmad, I. A. Bhatti, M. Iqbal, and A. Khan. 2015. Cytotoxicity reduction of wastewater treated by advanced oxidation process. *Chem. Int*. 1: 53-59.
- Rai, M., A. Yadav and A. Gade. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Journal of Biotechnology*, 27: 76-83.
- Rai, M., and A. Ingle. 2012. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Appl Microbiol Biotechnol*. 94: 287–293.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., and L. G. Iglesias-Andreu. 2016. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 1-7.
- Ramos-Castellá, A., L. G. Iglesias-Andreu, J. Bello-Bello, and H. Lee-Espinosa. 2014. Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 50: 576–81.
- Razzaq, A., R. H. M. Ammara., T. Jhanzab., A. Mahmood., Hafeez, and S. Hussain. 2016. A novel nanomaterial to enhance growth and yield of wheat. *Journal of nanoscience and technology*. 2(1): 55-58.
- Rico, C.M., S. Majumdar., M. Duarte-Gardea., J. R. Peralta-Videa., and J. L. GardeaTorresdey. 2011. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *J Agric Food Chem* 59:3485–3498.
- Riedel, S., and M. Kaupp. 2009. The highest oxidation states of the transition metal elements. *Coord Chem Rev*. 253(5–6): 606–624.

- Rizzo, L., 2011. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Res.* 45: 4311-4340.
- Robert, M. L., J. L. Herrera-Herrera, G. Herrera-Herrera, M. A. Herrera-Alamillo, and P. Fuentes-Carrillo. 2006. A new temporary immersion bioreactor system for micropropagation. *In: Plant cell culture protocols*. Humana Press. pp: 121-129.
- Roduner, E. 2006. Size matters: why nanomaterials are different. *Chem Soc Rev.* 35(7):583-592.
- Rondeau-Mouro, C., D. Defer., E. Leboeuf., and M. Lahaye. 2008. Assessment of cell wall porosity in *Arabidopsis thaliana* by NMR spectroscopy. *Int J Biol Macromol* 42:83–92.
- Safavi, K., M. Esfahanizadeh, D.H. Mortazaeinezhad, and H. Dastjerd 2011. International Conference on Life Science and Technology IPCBEE.
- Salama, H. M. H. 2012. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *Int. Res. J. Biotech.* 3: 190-197.
- Salazar-Rojas, V. M., B. E. Herrera-Cabrera, A. Delgado-Alvarado, M. Soto-Hernández, F. Castillo-González, and M. Cobos-Peralta. 2012. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genet Resour Crop Evol.* 59: 875–887.
- Sandal, I., A. Bhattacharya, and P. S. Ahuja. 2001. An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 65: 75-80.
- Santos-Pino, A., M. Cabrera-Jova, R. Gómez-Kosky, J. López-Torres, A. Rayas-Cabrera, M. Basail-Pérez, and Y. Beovides-Graía. 2011. Multiplication in temporary immersion system cocoyam clone “Viequera” (*Xanthosoma spp.*). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 13(2): 97–106.
- Sarmast M, Salehi H, Khosh-Khui M .2011. Nano silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of *Araucaria excelsa* R. Br. var. *glauca* explants. *Acta Biol. Hung* 62:477-484. doi: 10.1556/ABiol.62.2011.4.12.
- Sarsar V, Selwal KK, Selwal MK. 2014. Nanosilver: potent antimicrobial agent and its biosynthesis. *African Journal of Biotechnology* 13:546-554.
- Sasson, A. 2001. Cultivos transgénicos: hechos y desafíos. *Elfos Scientiae*. Ciudad de la Habana, Cuba. 377 pp.
- Savithramma, N., S. Ankanna, and G. Bhumi. 2012. Effect of nanoparticles on seed germination and seedling growth of *Boswellia ovalifoliolata* – an endemic and endangered medicinal tree taxón. *Nano Vision.* 2(1-3): 61-68.
- Scandalios, J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology.* 101: 7–12.

- Schützendübel, A., and A. Polle. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1351-1365.
- SEMARNAT, (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2002. Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) de Protección especial de especies nativas de México de Flora y Fauna silvestres. *Diario Oficial de la Federación*, marzo 6, pp 2–56.
- Servin, A., W. Elmer., A. Mukherjee., R. De La Torre-Roche., H. Hamdi., J. C. White., P. S. Bindraban., and C. O. Dimkpa. 2015. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *J Nanopart Res* 17:92.
- SETIS™, Bioreactor Temporary immersion systems in plant micropropagation. 2015. Consultado en línea el 21 de junio 2016. <https://www.goldbio.com/documents/1288/SETIS+Bioreactor.pdf>
- Shah, V., and I. Belozerova. 2009. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water, Air and Soil Pollution*, 197,143-148.
- Shahid, M., E. Pinelli, B. Pourrut, J. Silvestre, and C. Dumat. 2011. Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 78-84.
- Shahverdy, A.R., A. Fakhimi, and S. Minaian. 2007. Synthesis and effect of silver nanoprapcles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine-Nanotechnology biology and medicine*. 3(2): 168-171.
- Sharma, H., and B. D. Vashistha. 2015. Plant tissue culture: a biological tool for solving the problem of propagation of medicinally important Woody plants-A Review. *International Journal of Advanced Research*. 3(2): 402-411.
- Sharma, P., D. Bhatt, M.G. Zaidi, P.P. Saradhi, P.K. Khanna, and S. Arora. 2012. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167: 2225-33.
- Sheng, X., L. Jianlong., Z. Xinquan., W. Hong., and C. Langjun. 2006. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environmental and Experimental Botany* 56, 3, 274–285.
- Shrivastava, S., T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao and D. Dash. 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 18: 1- 9.

- Siddique, M.H., and M. H. Al-Whaibi. 2014. Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicum esculentum* seeds Mill). Saudi J Biol Sci 21:13–17.
- Simonton, W., C. Robacker., and S. Krueger. 1991. A programmable micropropagation apparatus using cycled medium. Plant Cell. Tissue. Organ Cult. 27:211-218.
- Singh, A. 2015. Micropropagation of plants. Bir Bahadur *et al.* (eds.), Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology, Springer India. 329-44.
- Sluis, C. J., and K. A. Walker. 1985. Commercialization of plant tissue culture propagation. Newslett. Int. Ass. Plant Tissue Cult. 47: 2-12.
- Smart, N. J., and M. W. Fowler. 1984. An airlift column bioreactor suitable for large scale cultivation of plant cell suspensions. J. Exp. Bot. 35: 531-537.
- Smith, C. J., B. J. Shaw, and R. D. Handv. 2007. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. Aquat Toxicol. 82: 94-109.
- Smith, M. A. L., and L. A. Spomer. 1994. Vessels, gels, liquid media and support systems. In: Aiktken-Christie J, Kosai T, Smith MAL (eds.). Automation and Environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 371-404.
- Soto-Arenas, M. A. 1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoín AC. SNIB-CONABIO proyecto No. J101. México DF.
- Soto-Arenas, M. A., and P. Cribb. 2010. A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla Plum.* ex Mill. (Orchidaceae: Vanillinae). Lakesteriana. 9: 355-398.
- Sreedhar, R. V. 2009. Novel approaches for molecular analyses, micropropagation and curing of vanilla (*Vanilla planifolia*). PhD thesis. University of Mysore, New Delhi, India.
- Stamploulis, D., S. K. Sinha, and J. C. White. 2009. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. Environmental Science and Technology. 43: 9473-9479.
- Stark, M. 2012. The sandpile model: optimal stress and hormesis. Dose Response. 10:66-74. Doi:10.2203/dose-response.11-010.Stark.
- Stegeman, J.J., M. Brouwer, T. D. G. Richard, L. Forlin, B. A. Fowler, B. M. Sanders, and P. A. van Veld. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress; Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L., Eds.; Lewis Publishers: Chelsea, MI, pp: 235–335.

- Steinmacher, D. A., M. P. Guerra, R. Lieberei, and K. Saare-Surminski. 2011. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Ann. Bot.* 108: 1463-1475.
- Takayama, S. 1991. Mass propagation of plants through shake and bioreactor culture techniques. In: Bajaj YPS (ed.) Hightech. And Micropropagation. Springer-Verlag, Berlin. *Biotechnol. Agricul. For.* 17: 1-46.
- Takayama, S., and M. Misawa. 1981. Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture. *Plant Cell Physiol.* 22: 461-467.
- Tan, B. C., C. F. Chin, and P. Alderson. 2011. Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 105: 457-463.
- Tanti, B., A. K. Das, H. Kakati, and D. Chowdhury. 2012. Cytotoxic effect of silver-nanoparticles on root meristem of *Allium sativum* L. *Journal of research in Nanobiotechnology.* 1: 1-8.
- Tautorus, T. E., and D. I. Dunstan. 1995. Scale up of embryogenic plant suspension cultures in bioreactors. In: Jain M, Gupta PK, Newton RJ (eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants.* Kluwer Acad Publ. Dordrecht. The Netherlands. 1: 265-269.
- Tisserat, B., and C. E. Vandercook. 1985. Development of an automated plant culture system. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 5: 107-117.
- Torres-González, M. J, J. F. Aguirre-Medina, and L. Iracheta-Donjuan. 2011. Germinación de semillas y obtención de plántulas de *Vanilla planifolia* Andrews en condiciones *in vitro*. *Agroproductividad.* 4: 3-8.
- Vaiserman, A. M. 2011. Hormesis and epigenetics: is there a link?. *Ageing Res. Rev.* 10, 413-421. Doi: 10.1016/j.arr.2011.01.004.
- Valencia, Q. P. R. 1992. Efecto de los Insecticidas carbamicos Metomil y Oxamil sobre los cromosomas de las células meristematicas de la raíz de *Vicia faba*, UNAM, Disertación – Tesis de Maestría e Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Van der Oost, R., J. Beyer., and N. P. E. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57–149.
- Vannini, C., G. Domingo, E. Onelli, B. Prinsi, M. Marsoni, and L. Espen. 2013. Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. *PLoS ONE.* 8(7) p 6875.
- Vazquez-Muñoz, R., M. Avalos-Borja, and E. Castro-Longoria. 2014. Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. *Plos ONE.* 9(10):108876.
- Viashnavi, B., G. Rameshkumar, T. Rajagopal, and P. Ponmanickam. 2015. Evaluation of bactericidal and fungicidal properties of

- silver nanoparticles fabricated using *Jasminum sambac* (L.). Global Journal of Biotechnology and Biochemistry. 10(1): 22-31.
- Vyom, S., K. Ashutosh., and D. Alok. 2012. Nanomaterials: exposure, effects and toxicity assessment. Review. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences©. The National Academy of Sciences, India.
- Walters, C. R., J. Edmund, Pool, and V. S. Somerset. 2014. Ecotoxicity of silver nanomaterials in the aquatic environment: A review of literature and gaps in nano-toxicological research. Journal of Environmental Science and Health. Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering. 49(13): 1588-1601.
- Wang, J., Y. Koo., A. Alexander., Y. Yang., S. Westerhof., Q. B. Zhang., J. L. Schnoor., V. L. Colvin., J. Braam., and P. J. J. Alvarez. 2013^a. Phytostimulation of poplars and Arabidopsis exposed to silver nanoparticles and Ag⁺ at sublethal concentrations. Environ Sci Technol 47:5442–5449.
- Wang, J., H. Mao., H. Zhao., D. Huang., and Z. Wang. 2012^a. Different increases in maize and wheat grain zinc concentrations caused by soil and foliar applications of zinc in Loess Plateau China. Field Crops Res 135:89–96.
- Wang, X., S. Hai-xing., L. Qiang., R. Xiang-min., P. Jian-wei., X. Gui-xian., Z. Zhen-hua., and W. Shu-juan. 2011. Effects of nano-preparation coated nitrogen fertilizer on nutrient absorption and yield of earlyrice. Hunan Agricultural Sciences11: 1-4.
- Wang, Z., X. Xie., J. Zhao., X. Liu., W. Feng., J. C. White., and B. Xing. 2012^b. Xylem- and phloem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L). Environ Sci Technol 46:4434–4441.
- Watt, M. P. 2012. The status of temporary inmersión system (TIS) technology for plant micropropagation. African Journal of Biotechnology. 11(76): 14025-14035.
- Wiegant, F. A., H. A. Prins and R. Van Wijk. 2011. Postconditioning hormesis put in perspective: an overview of experimental and clinical studies. Dose Response. 9:209-224. doi: 10.2203/dose-response.10-004.Wiegant.
- Wilsnack, R., F. Meyer, and J. Smith. 1973. Human cell culture toxicity testing of medical devices and correlation to animal tests. Artif. Cell. Blood Substit. Biotechnol. 1: 543-562.
- Wu, M., H. Ruo-chao., T. Xiao-hai., W. Xiao-ling., M. Guo-hui., and T. Hai-tao. 2010. Effect of Adding Nano-carbon in slow release fertilizer on grain yield and nitrogen use efficiency of super hybrid rice. Hybrid Rice 4,1-5.
- Xu, S., J. Li., X. Zhang., H. Wei., and L. Cui. 2006. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat

- stress. *Environ. Exp. Bot.* 56, 274-285. doi:10.1016/j.envexpbot.2005.03.002.
- Yasur, J., and P. Rani. 2013 Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environ Sci Pollut Res.*
- Yi, M., H. Yi, H. Li, and L. Wu. 2010. Aluminum induces chromosome aberrations, micronuclei, and cell cycle dysfunction in root cells of *Vicia faba*. *Environ. Toxicol.* 25: 124-129.
- Yin, L., B.P. Colman, B.M. McGill, J.P. Wright, and E.S. Bernhardt. 2012. Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants, *PLoS One.* 7(10): 47-67.
- Yin, L., Y. Cheng, B. Espinasse, B.P. Colman, M. Auffan, and M. Wiesner. 2011. More than the ions: the effect of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*, *Environ. Sci. Technol.* 45: 2360- 2367.
- Zerihun, A., M. Ayelign, T. Alemayehu, and T. Wondyfraw. 2009. Efficient in vitro multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in Ethiopia. *Afr J Biotechnol.* 8: 6817–6821.
- Zhang, D., T. Hua., F. Xiao., C. Chen., R. M. Gersberg., Y. Liu., D. Stuckey., W. J. Ng., and S. K. Tan. 2015^a. Phytotoxicity and bioaccumulation of ZnO nanoparticles in *Schoenoplectus tabernaemontani*. *Chemosphere* 120:211–219.
- Zhao, L. , Y. Sun., J. A. Hernandez-Viezcas., A. D. Servin., J. Hong., G. H. Niu., J. R. Peralta-Videa., M. Duarte-Gardea., and J. L. Gardea-Torresdey. 2013. Influence of CeO₂ and ZnO nanoparticles on cucumber physiological markers and bioaccumulation of Ce and Zn: a life cycle study. *J Agric Food Chem* 61:11945–11951.
- Ziv, M. 1989. Enhanced shoot and cornlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth retardants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 17: 101-110.
- Ziv, M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. *Horticulture Review.* 24: 1-30.
- Ziv, M. 2005. Simple bioreactors for the mass propagation of plants. *Plant Cell. Tissue. Organ Cult.* 81:277-285.
- Ziv, M., G. Ronen, and M. Raviv. 1998. Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for large scale micropropagation of plants. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 34: 152- 158.
- Zuverza-Mena, N., R. Armendariz., J. R. Peralta-Videa., and J. L. Gardea-Torresdey. 2016. Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: Root growth reduction and modifications in the nutritional value. *Front. Plant Sci.* 7:9. Doi: 10.3389/fpls.2016.00090.