

Revisión Bibliográfica

Nanobiotecnología en las plantas. Estado del arte

Nanotechnology in the plants. State of the art

María del Carmen Hernández-León y Rafael Gómez-Kosky

Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA, Villa Clara). Autopista Nacional km 246. Ranchuelo. CP 53100. Villa Clara. Cuba
email: rafael.kosky@inicavc.azcuba.cu

Resumen

La aplicación de la nanotecnología en el sector agroalimentario es uno de los campos de más rápido crecimiento en la nano-investigación. Innovar y generar tecnología para producir la cantidad y la calidad de alimentos suficientes para alimentar a una población mundial en rápido crecimiento de los tiempos modernos, siempre será el mayor desafío. Con la Nanotecnología se abre un amplio abanico de oportunidades en la biotecnología de las plantas. Se muestran sus efectos en la desinfección de las superficies de los explantes, formación de callos, organogénesis, crecimiento de brotes *in vitro*, enraizamiento, producción de metabolitos, variación somaclonal, transformación genética, cultivo de células. Se espera que esta revisión crítica pueda proporcionar la información básica sobre los antecedentes en la investigación nanobiotecnológica, que permita avanzar con la experimentación en las aplicaciones de las nanopartículas en este campo.

Palabras claves: nanotecnología, cultivo *in vitro*, nanopartículas, enraizamiento

Abstract

The application of nanotechnology in the agri-food sector is one of the fastest growing fields of nano-research. Innovating and generating technology to produce sufficient quantity and quality of food to feed a rapidly growing world population in modern times will always be the greatest challenge. Nanotechnology opens up a wide range of opportunities in plant biotechnology. Its effects on explant surface disinfection, callus formation, organogenesis, *in vitro* shoot growth, rooting, metabolite production, somaclonal variation, genetic transformation, cell culture are shown. It is hoped that this critical review can provide the basic background information on nanobiotechnological research, which will allow to move forward with experimentation on nanoparticle applications in this field.

Keywords: nanotechnology, *in vitro* cultivation, nanoparticles, rooting

Introducción

El cultivo de tejidos vegetales consiste en el crecimiento de células vegetales o partes de plantas en un medio nutriente en un entorno controlado, estéril y simulado. Es una técnica importante tanto para áreas básicas como aplicadas de la biología vegetal, como citología, embriogénesis, morfogénesis, nutrición, patología y conservación de germoplasma, manipulación genética, propagación clonar a gran escala y producción de plantas libres de patógenos y metabolitos útiles (Kim *et al.*, 2017).

Un protocolo de regeneración de plantas eficiente es obligatorio para la transformación genética y la propagación masiva. El éxito del cultivo de plantas *in vitro* depende de varios factores, como el genotipo, el estado fisiológico de las plantas donantes, el tipo de explantes, los métodos de desinfección de la superficie, el medio de cultivo, los reguladores del crecimiento de las plantas, el tamaño de los recipientes de cultivo, la calidad espectral, intensidad de luz, fotoperiodo y temperatura. La composición del medio de cultivo influye fuertemente en el potencial morfogénico de los explantes.

El medio de cultivo generalmente consiste en macro y micronutrientes minerales, suplementos orgánicos, aminoácidos, vitaminas, fuentes de carbono, reguladores del crecimiento de las plantas y agentes solidificantes. La optimización de los elementos minerales en el medio de cultivo mejora el crecimiento y la morfogénesis de los explantes; también mejora la proliferación celular, la organogénesis, la embriogénesis somática, la calidad de los brotes y el contenido de compuestos bioactivos en cultivos de células y órganos (Thorpe, 2014).

La "Nano-Era" inició a finales de la década de los 90, cuando Richard Feynman (diciembre de 1959) dio una charla en una de las reuniones anuales de la *American Physical Society* en Caltech, sentando las bases conceptuales para el campo ahora llamado nanotecnología. En los Estados Unidos, la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (*National Nanotechnology Initiative*), creada al principio de los 2000, ha coordinado la investigación y desarrollo de nanotecnología. Desde entonces el número de nanomateriales (NMs) basados en carbón y metales han sido producidos y actualmente utilizados en muchos campos. Comúnmente cuando se habla de nanomateriales se refieren a objetos pequeños con una o más dimensiones externas en el rango entre 1-100 nm (Zuverza-Mena *et al.*, 2016).

La nanotecnología bombardea todos los ámbitos de la vida y todas las disciplinas de la ciencia, ya sea biología, química, física, ingeniería, medicina o biotecnología para crear nuevos materiales que tienen propiedades únicas porque sus estructuras se determinan en la escala nanométrica. Algunos de estos materiales ya se han introducido en productos de consumo, como filtros solares y pinturas y textiles resistentes a las manchas. Otros están siendo investigados intensamente para encontrar soluciones a los mayores problemas de la humanidad: enfermedades, energía limpia, agua limpia y un medio ambiente más limpio (Vasyukova *et al.*, 2021; Kokina y Plaksenkova, 2022).

Algunas de las aplicaciones notables de los nanomateriales incluyen: cosméticos (por ejemplo, lociones de protección solar con propiedades de absorción de radiación). Materiales nanocompuestos y nanotubos como filtros reforzados para mejorar las propiedades mecánicas

de los nanocompuestos e impartir nuevas propiedades (ópticas, electrónicas, etc.). *Nanocoatings*, donde se puede usar un nanómetro de espesor de un nanomaterial para mejorar propiedades como el desgaste y la resistencia a los arañazos, propiedades optoelectrónicas y propiedades hidrofóbicas. Herramientas de corte duro que utilizan nanocompuestos de metal como el carburo de tungsteno, carburo de tantalio y carburo de titanio, que han mejorado el desgaste y la resistencia a la erosión, y duran más que sus materiales a granel convencionales. También la realización de pantallas, utilizando nanotubos de carbono como dispositivos de emisión para monitores y televisores (FED: pantallas de emisión) (Ávalos *et al.*, 2013).

Además, de baterías ligeras de alta densidad de energía; aditivos para combustibles y materiales catalíticamente eficientes; nanoesferas como lubricantes; materiales magnéticos a nanoescala en dispositivos de almacenamiento de datos; membranas nanoestructuradas para la purificación del agua; y por último, pero no menos importante, los insumos en nanoelectrónica, nanobiotecnología y nanomedicina (Kim *et al.*, 2017).

En revistas de biotecnología sobre la aplicación de las nanopartículas en cultivos de tejidos vegetales, no hubo revisiones consolidadas sobre este tema. Esta revisión resume los logros actuales con respecto al uso de nanopartículas (NP) en el cultivo de tejidos vegetales. Se presentan los hitos logrados en la eliminación de la contaminación microbiana en cultivos de plantas, formación de callos, organogénesis, embriogénesis somática, variación somaclonal, transformación genética y producción de metabolitos a través de la introducción de nanomateriales. La necesidad de incorporar más de los nanomateriales de la nueva era, como las *buckybolitas* de grafito y carbono y la posibilidad de crear nanoambientes para el cultivo efectivo de tejidos vegetales se especula en la sección de prospectos futuros.

Logros nanotecnológicos en la Agricultura

Hay numerosos informes que indican aportes positivos de la nanotecnología en la agricultura actual. Las nanopartículas (NP) se han utilizado ampliamente para mejorar la germinación de las semillas, mejorar el crecimiento y el rendimiento de las plantas, permitir la modificación genética de las plantas, mejorar la producción de compuestos bioactivos y lograr la protección de las plantas (Wang *et al.*, 2016). En el tratamiento de semillas de tomate con dióxido de silicio (SiO₂), las NP aumentaron el porcentaje de germinación de semillas y el crecimiento de las plántulas. La aplicación de nano-fertilizantes de hierro y magnesio mejoró significativamente el número de semillas por vaina y el contenido de proteína de semilla en guisantes de ojo negro. Los mesoporos de sílice taponeados con nanopartículas de oro entregaron ADN en los protoplastos, células y hojas de tabaco. El tratamiento de plántulas de regaliz con óxido de cobre (CuO) y óxido de zinc (ZnO) incrementó el contenido de antocianinas, avonoides, glicirricina, compuestos fenólicos y taninos.

Según Kim *et al.* (2017) las nanopartículas de sílice-plata poseen actividad antimicrobiana contra varios patógenos de plantas. Se encontró que la aplicación de NP de sílice-plata a plantas infectadas de calabacín verde es útil para el control del mildiú en polvo. Estudios recientes han demostrado que la desinfección de la superficie de los explantes con NP reduce significativamente la contaminación microbiana en varias plantas.

Los nanomateriales hacia la formación de callos, organogénesis, crecimiento de brotes y enraizamiento.

Varios estudios han mostrado efectos positivos de las NPs en la inducción de callos, la regeneración de brotes y el crecimiento. En *Brassica nigra*, la adición de NPs ZnO (500–1500 mg L⁻¹) al medio de cultivo Murashige-Skoog (1962) (MS) inhibió significativamente la germinación de las semillas. En presencia de NPs ZnO, las longitudes de los brotes y las raíces se afectaron significativamente. Por otro lado, el crecimiento de los explantes de vástago de *B. nigra* en medio MS que contiene 1–20 mg L⁻¹ NPs ZnO dio lugar a la formación de raíces (Zafar *et al.*, 2016). Al respecto Kumar *et al.* (2013) informaron que la incorporación de NPs Au en el medio basal MS mejoró el porcentaje de germinación de semillas y crecimiento de plántulas en *Arabidopsis thaliana*.

La longitud de la vaina y el número de semillas fueron mayores en las plantas tratadas con 10 mg ml⁻¹ NPs Au. El tratamiento con NPs Au mejoró la actividad de la enzima antioxidante y llevó a una disminución en la expresión de microRNAs (miR398 y miR408) en *A. thaliana*. Estas variaciones fisiológicas y moleculares podrían ser responsables de los efectos beneficiosos de las NPs Au. La inclusión de 5 mg L⁻¹ NPs de sulfato de cobre (NPs CuSO₄) en el medio MS aumentó significativamente la longitud del brote (52% sobre el control), la longitud de la raíz (21% sobre el control) y el peso fresco (39% sobre el control) de plántulas de *Verbena bipinnatifida* Nutt. (Genady *et al.*, 2016).

La adición de 0,5 mg L⁻¹ NPs Cu y 0,8 mg L⁻¹ NPs Co al medio de cultivo MS modificado aumentó el número de brotes, la longitud de brotes *in vitro* y el enraizamiento en *Mentha longifolia* (Talankova-Sereda *et al.*, 2016). La frecuencia más alta de la formación de brotes (89.6%) se obtuvo cuando los explantes nodales de *Stevia rebaudiana* se cultivaron en medio de cultivo MS modificado con 1 mg L⁻¹ NPs ZnO.

En el caso del tomate (*Solanum lycopersicum*), se logró el crecimiento de callos y regeneración de plantas un medio de cultivo que contenía 15 mg L⁻¹ NPs ZnO y 3,0 g L⁻¹ NaCl. Las NPs ZnO mitigaron los efectos de NaCl al aumentar las enzimas antioxidantes como GPX y SOD (Alharby *et al.*, 2016). En *Solanum nigrum*, la frecuencia de formación de callos (89%) y el peso fresco del callo (4,67 g por explante de hoja) se incrementaron en medio de cultivo MS aumentado con 5 mg L⁻¹ 6-bencilaminopurina (6-BAP), 3 mg L⁻¹ ácido naftalenacético (ANA) y 8 mg L⁻¹ NPs Ag (Ewais *et al.*, 2015). También, Ghorbanpour y Hadian (2015) investigaron el efecto de los nanotubos de carbono de paredes múltiples (25–500 mg mL⁻¹) en la inducción de callos de explantes de hojas de la planta medicinal *Satureja khuzestanica*. El crecimiento del callo mejoró significativamente en el medio de cultivo B5 con 25–50 mg mL⁻¹. Sin embargo, la presencia de nanotubos de carbono de paredes múltiples en 100–500 mg mL⁻¹ disminuyó la biomasa del callo en esta especie.

Según señalaron Siddiqui *et al.* (2015) la incorporación de 100 mg mL⁻¹ de nanotubos de carbono de paredes múltiples a un medio de cultivo que contenía 1 mg L⁻¹ 2,4-D aumentó el crecimiento de callos de los explantes de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (64% de aumento sobre el control). El tratamiento con nanotubos de carbono mejoró el crecimiento del callo mediante la regulación positiva de los genes involucrados en la división celular (CycB), la extensión de la pared celular

(NtLRX1) y el transporte de agua (NtPIP1). Sin embargo, el tratamiento con nanotubos de carbono (10–600 mg L⁻¹) disminuyó la viabilidad celular y el peso seco en *Arabidopsis*. De manera similar, la adición de nanotubos de carbono a los cultivos en suspensión de células de arroz (*Oryza sativa*) disminuyó la viabilidad celular. La presencia de NPs de carbono en el medio de cultivo MS redujo la frecuencia de la inducción del callo en *Linum usitatissimum*. También, informaron Poborilova et al. (2013) la adición de NPs Al₂O₃ (10–100 mg mL⁻¹) a los cultivos en suspensión de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) disminuyó significativamente la viabilidad celular a través de la generación de oxígeno reactivo (ROS) y especies de nitrógeno (RNS).

Según Liu et al., (2017) la *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. se utilizó como planta modelo para investigar la respuesta bioquímica y molecular tras la exposición conjunta a nanopartículas de tetraciclina (TC) y óxido de titanio (NP de TiO₂). Los resultados mostraron que 1 mg L⁻¹ de TC redujo gravemente la biomasa de *A. thaliana* en un 33,3 % en comparación con el control; sin embargo, la presencia de 50 y 100 mg/L de NP de TiO₂ alivió la toxicidad del TC, aumentando la biomasa fresca en un 45% y un 28%, respectivamente, en relación con el tratamiento con TC solo. La presencia de TC disminuyó notablemente la acumulación de Ti tanto en brotes como en raíces. La actividad de las enzimas antioxidantes, incluida la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la ascorbato peroxidasa (APX) y la peroxidasa (POD), en los tejidos del brote y la raíz de *A. thaliana* indicaron que la TC aumentó significativamente la actividad de los eliminadores de especies reactivas de oxígeno (ROS). Sin embargo, en los tratamientos de coexposición, las NP de TiO₂ redujeron la actividad de la enzima antioxidante a los niveles de control.

También, en explantes *in vitro* de banano (*Musa sp.*), la mayor frecuencia de embriogénesis somática se observó en medio de cultivo MS suplementado con 100 mg L⁻¹ NPs Zn seguidos de NPs ZnO. La longitud de los brotes y raíces *in vitro* también aumentaron al agregar ambas NPs a igual medio de cultivo. Sin embargo, las concentraciones más altas disminuyeron el crecimiento del callo y aumentaron la actividad de la enzima antioxidante (Helaly et al., 2014)

Por su parte, Anwaar et al., (2016) informaron que la adición de NPs CuO (15–20 mg L⁻¹) incrementó la organogénesis en los cultivares de arroz (*Oryza sativa*). En *Daucus carota*, la proliferación celular y el número de embriones somáticos disminuyeron en el medio de cultivo MS que contiene Fe₃O₄. Se ha informado que las NPs TiO₂ pueden jugar un papel similar a los reguladores del crecimiento de las plantas (PGR) como la citoquinina y el ácido giberélico. El número y tamaño de callos aumentaron cuando los embriones maduros de cebada (*Hordeum vulgare*) se cultivaron en medio de cultivo con 20 mg L⁻¹ ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 60 mg ml⁻¹ NPs TiO₂ (Kokina y Plaksenkova, 2022).

En el caso de la especie *Linum usitatissimum* (Kokina et al., 2013) prepararon polvo de 6-BAP (6-bencilaminopurina) cubierto con NPs Au y NPs Ag y lo agregaron al medio de cultivo. Los segmentos del tallo se cultivaron en medio de cultivo MS con 1 mg L⁻¹ 2,4-D más 1 mg L⁻¹ BAP o 1 mg L⁻¹ Au BAP o Ag BAP. La inclusión de NPs Au y NPs Ag en el medio de cultivo MS aumentó la embriogénesis (70% y 50%, respectivamente). Estos autores confirmaron la deposición de las NPs en las células y plantearon la hipótesis de que las plantas toman activamente los reguladores del crecimiento (RC) y las NPs de metales se transportan junto con los RC. Sin embargo, el

mecanismo real a través del cual las NPs Au incrementaron la embriogénesis somática aún no está claro y necesita más investigación.

Además, [Fazal et al.](#) (2016) estudiaron los efectos de las NPs Au y NPs Ag individualmente o en combinación sobre la proliferación de callos en *Prunella vulgaris*. Las NPs Ag (30 mg L⁻¹), Ag – Au (1:2) y Ag – Au (2:1) en combinación con la auxina ANA (2,0 mg L⁻¹) aumentaron la proliferación de callos (100%) en comparación con el control (95%). La mayor biomasa se obtuvo cuando el medio de cultivo se aumentó con NPs Au.

Por lo tanto, de todas estas investigaciones se puede concluir que la adición de NPs a un medio de cultivo de tejido vegetal afecta la proliferación de callos, la multiplicación de brotes, la embriogénesis somática y el enraizamiento. Al alterar estas las actividades de las enzimas antioxidantes, la expresión de genes, la inhibición de la producción de etileno y la producción de ROS. Sin embargo, los mecanismos reales de los efectos promotores o inhibidores de las NPs en cada parámetro deben investigarse en detalle.

Los efectos de varias NPs de metal y óxido de metal en las plantas están bien documentados *in vivo*; tales NPs se pueden usar para promover o mejorar el potencial morfológico de los explantes obtenidos de diferentes especies de plantas. La influencia de diferentes concentraciones y combinaciones de NPs en varios medios de cultivo (establecimiento, multiplicación de brotes y enraizamiento) también merece una evaluación, con el fin de obtener una comprensión clara de los mecanismos subyacentes detrás del papel de las NPs en el cultivo de tejidos de plantas.

Efecto de los nanomateriales en la transformación genética

Los métodos de transformación por electroporación y bombardeo de partículas (directo) y mediado por Agro-bacterium (indirecto) se utilizan para suministrar un gen extraño a las células, tejidos y órganos de las plantas. La técnica de electroporación ha sido ampliamente utilizada para transferir genes a protoplastos. Sin embargo, el aislamiento y la regeneración de protoplastos no es tan fácil. Al respecto [Bansod et al.](#), (2015) informaron que la incorporación de 10 mg L⁻¹ NPs Ag en el buzón de incubación de hojas mejoró el rendimiento de protoplastos viables en el tabaco (*Nicotiana tabacum*). Esto es útil para minimizar el daño causado por las enzimas celulolíticas durante el aislamiento de protoplastos y la mejora de los costos (que es otra limitación más en el aislamiento de protoplastos). También, [Torney et al.](#) (2007) demostraron que las NPs Si mesoporosas podrían usarse para administrar ADN en protoplastos de tabaco (*Nicotiana tabacum*) mediante endocitosis; las NPs, el ADN y los productos químicos de sílice mesoporosa con casquillo de oro se administraron en el callo y se fueron con un arma biolística.

Además, [Vijayakumar et al.](#) (2010) señalaron que las NPs Au soportadas por carbono entregaron ADN más eficientemente en *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa* y *Leucaena leucocephala* en comparación con las partículas regulares de oro usando una pistola de genes. Las cantidades de oro y plásmido presentes en los NPs Au soportados en carbono fueron 4 y 3 veces menores, respectivamente, en comparación con las partículas de oro micrometersized comerciales. Además, el daño celular de la planta es mínimo y, por lo tanto, la regeneración de la planta y la frecuencia de transformación aumentan. En la transformación mediada por *Agrobacterium*, se

han utilizado antibióticos como la carbenicilina, la cefotaxima, la rifamicina y la timentina para eliminar las bacterias después del co-cultivo. Sin embargo, sus efectos fitotóxicos en los explantes afectaron el potencial de regeneración y la estabilidad genética de las plántulas regeneradas.

En relación con lo anterior, Sarmast y Salehi (2016) informaron que el crecimiento de *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens* se suprimió completamente en medio LB que contenía 10 mg ml⁻¹ NPsAg. Estos autores también demostraron que la adición de NPs Ag al medio de cultivo eliminaron con éxito las bacterias después del co-cultivo durante la transformación genética mediada por *Agrobacterium* de *T. undulata* y tabaco (*Nicotiana tabacum*). Otras NPs requieren pruebas adicionales para proporcionar evidencia de que eliminan *Agrobacterium* en las células, tejidos y órganos de varias plantas luego del co-cultivo.

Pasupathy et al. (2008) desarrollaron un nuevo método de administración de genes en plantas utilizando dendrímeros de poli (amidoamina). Los autores alcanzaron con éxito transferir el ADN plasmídico que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) a las células de césped. La eficacia de transfección se mejoró aún más optimizando el pH del medio de cultivo y la relación molar del dendrímero al ADN plasmídico. También, Naqvi et al. (2012) utilizaron NPs de fosfato de calcio (CaP) para administrar el plásmido pCambia 1301 que alberga el gen GUS en *Brassica juncea*. La mejor eficacia de transformación se observó con NPs CaP (80.7%), seguido de *Agrobacterium tumefaciens* (54.4%) y ADN control (8%).

También, Ardekani et al. (2014) informaron que las NPs CaP permitieron la transferencia del plásmido pBI121 que albergaba el gen GFP en células de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Se han usado NPs mesoporosos de sílice para suministrar ADN plasmídico a protoplastos de tabaco y raíces intactas de *Arabidopsis*. Las NPs magnéticas de Au pueden entregar ADN plasmídico a las células y protoplastos de plantas de canola (*Brassica napus*) y zanahoria (*Daucus carota*). La administración de genes mediada por NPs en plantas tiene una gran importancia en la nanobiotecnología (Soumya et al., 2023). Se requiere investigación adicional para estudiar los efectos de diferentes NPs en la manipulación genética de varias especies de plantas.

La influencia de los nanomateriales en la variación somaclonal

Los cambios observados en órganos y plántulas desarrollados *in vitro* se denominan variación somaclonal. Generalmente se asocia con cambios en el número de cromosomas, la estructura cromosómica, la secuencia de ADN, la metilación del ADN, el cruce mitótico y la activación de elementos transponibles. La variación somaclonal tiene ventajas y desventajas en el cultivo de tejidos de plantas. Las variantes poseen varias características útiles como el tamaño de la planta, el color más oscuro, la variabilidad de la hoja, la maduración de la fruta, la producción de metabolitos secundarios y la resistencia a los estreses bióticos y abióticos. Varios estudios han demostrado la fitotoxicidad de las NPs aplicadas principalmente a niveles más altos. Los tratamientos de NPs afectan el índice mitótico y la integridad del ADN, alteran la expresión de la proteína y el ADN en las plantas. El nivel de ploidía en callos de la especie *L. usitatissimum* se afectó significativamente en el medio de cultivo MS que contenía NPs C. La suplementación de NPs C mejoró el número de células tetraploides. El nivel de metilación del ADN también fue mayor en los callos cultivados en medio de cultivo con NPs C (Kim et al., 2017; Kokina y Plaksenkova, 2022).

Al respecto Kokina *et al.* (2017) investigaron los efectos de las NPs Au y NPs Ag sobre la variación somaclonal en *L. usitatissimum*. La ocurrencia de variación somaclonal fue mayor en los brotes tanto de callos como los regenerantes que crecieron en medios de cultivo que contenían NPs Au que en NPs Ag. También, Ewais *et al.* (2015) informaron que la adición de NPs Ag al medio de cultivo indujo variaciones en la morfología y anatomía de los callos al alterar la proteína y el perfil de ADN en *Solanum nigrum*. Se requieren continuar las investigaciones para determinar los efectos de una amplia gama de NPs para mejorar la variación somaclonal.

Influencia de los nanométriales en los metabolitos secundarios

Las plantas son una fuente rica de diversos metabolitos secundarios bioactivos, que desempeñan un papel importante en la supervivencia de las mismas en sus respectivos entornos. Se ha demostrado que el cultivo *in vitro* de células y órganos de plantas es ventajoso para la producción de metabolitos secundarios. El contenido de compuestos secundarios en cultivos de células y órganos se mejoró significativamente al optimizar la composición del medio de cultivo, la incorporación de precursores, elicitores y proporcionar condiciones de cultivo apropiadas. Las NPs añadidas al medio de cultivo *in vitro* actúan como una fuente de nutrientes y un elicitador (Kim *et al.*, 2017; Holghoomi y Colagar, 2024).

Por su parte, Poborilova *et al.* (2013) señalaron que la adición de NPs Al_2O_3 (10–100 mg mL^{-1}) a los cultivos en suspensión de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) aumentó significativamente el contenido fenólico. La acumulación de compuestos fenólicos en las células dependió de la dosis y del tiempo de exposición. También, Hashim y Aseel Salih (2014) informaron que el contenido de aceite esencial en cultivo de callos de *Calendula officinalis* L. se incrementó en gran medida en el medio de cultivo MS modificado con 0,3 mg L^{-1} NPs Ag. La presencia de NPs TiO_2 (4,5 o 6,0 mg L^{-1}) aumentó significativamente el contenido de ácido gálico, ácido clorogénico, ácido o-cumárico, ácido tánico y ácido cinámico en callos embriogénicos de *Cicer arietinum*. La aplicación de NPs Au y NPs Ag (1:3) indujeron la acumulación máxima de compuestos fenólicos totales y de flavonoides en los cultivos de callos de *Prunella vulgaris*.

Por otra parte Syu *et al.* (2014) refirieron que la forma de las NPs Ag desempeña un papel importante en la producción de antocianinas en *Arabidopsis*. El tratamiento con NPs Ag esféricas resultó en los niveles más altos de acumulación de antocianinas en las plántulas. Los brotes de *Vainilla planifolia* cultivados en medio de cultivo MS suplementado con 25 y 50 mg L^{-1} NPs Ag mostraron un aumento significativo en el contenido fenólico total. También, Chamani *et al.* (2015) informaron la acumulación de compuestos bioactivos específicos en *Lilium ledebourii* y su dependencia sobre la concentración de NPs ZnO en el medio de cultivo MS. El mayor contenido de ononoides, fenoles y antocianinas se obtuvo en medio de cultivo complementado con 25, 75 y 100 mg L^{-1} NPs ZnO, respectivamente. La acumulación de glucósidos de esteviol en los cultivos de brotes de *S. rebaudiana* se incrementó significativamente en el medio de cultivo MS f con 1 mg L^{-1} ZnO. Además, el contenido total de flavonoides y fenólicos también aumentó con el tratamiento con ZnO. Sin embargo, las concentraciones más altas de ZnO llevaron a una disminución en la producción de metabolitos secundarios debido a los efectos fitotóxicos de ZnO.

Además, Desai *et al.* (2015) señalaron que la adición de 50–1000 mg L⁻¹ NPs Zn disminuyó la producción de esteviósido en cultivos de brotes *in vitro* de la especie *Stevia rebaudiana*. Según informaron Ghorbanpour y Hadian (2015) el contenido de fenólicos totales en las plantas *in vitro* de *Verbena bipinnati* se multiplicaron por dos cuando se cultivaron en medio de cultivo MS que contenía 5 mM de NPs CuSO₄. La aplicación de NPs Cu y NPs Co incrementaron el contenido de aceite esencial en *Mentha longifolia* en 2,23 y 2,19%, respectivamente. En los cultivos foliares de la especie *S. khuzestanica*, la incorporación de nanotubos de carbono de paredes múltiples en el medio de cultivo B5 (25 o 50 mg mL⁻¹) proporcionó un crecimiento máximo del callo, mientras que el mayor contenido de fenólicos, flavonoides, ácido rosmarínico y ácido cafeico se obtuvo en medio de cultivo con 100 o 250 mg mL⁻¹ estos nanotubos de carbono

También, Zhang *et al.* (2013) investigaron el potencial de obtención de NPs Ag en el aumento del contenido de artemisinina en cultivos de raíces adventicias de *Artemisia annua*. La producción de artemisinina mostró un aumento de 3,9 veces cuando los cultivos se trataron con 900 mg L⁻¹ NPs Ag durante 3 días. De manera similar, el mayor contenido de artemisinina (aumento de 2,2 veces sobre el control) se obtuvo en cultivos de suspensión celular de *A. annua* con 24 mg de tratamiento con 5 mg L⁻¹ NPs Co. Estos autores concluyeron que el tratamiento con NPs Co aumentó el contenido de artemisinina como resultado de la regulación negativa de los genes SQS y DBR2.

Por su parte Shakeran *et al.* (2015) señalaron los efectos del AgNO₃ y NPs Ag en la producción de atropina en cultivos de raíces pilosas del arbusto *Datura metel*. Los cultivos de raíces pilosas se expusieron a inductores durante 12, 24 y 48 h. Entre los inductores estudiados, las NPs Ag fueron las más efectivas para mejorar el contenido de atropina en las raíces pilosas.

Además, Raei *et al.* (2014) informaron que las células de suspensión de *Aloe vera* que interactúan con 0,625 mg L⁻¹ NPs Ag o 120 mg L⁻¹ NPs TiO₂ durante 48 h exhibieron un contenido de aloína significativamente mayor. El mayor contenido de aloína se obtuvo después del tratamiento con NPs TiO₂. También, Bhat y Bhat (2016) refirieron que la adición de NPs Ag a 3 mg L⁻¹ a una suspensión de células de *Capsicum frutescens* aumentó el contenido de capsaicina aproximadamente 2 veces. El tratamiento de un cultivo en suspensión de células de *Corylus avellana* con 5 mg L⁻¹ NPs Ag aumentó significativamente la producción de taxol. Sin embargo, el tratamiento con 2,5 y 10 mg L⁻¹ NPs Ag redujo el potencial de producción de taxol de las células a 60 y 56% del control, respectivamente. Según señalaron Moharrami *et al.* (2017) las NPs Fe (450–3600 mg L⁻¹) tuvieron potencial para aumentar el contenido de hiosciamina y escopolamina en cultivos de raíces pilosas de *Hyoscyamus reticulatus*. La exposición de los cultivos de raíces pilosas a 900 mg L⁻¹ NPs Fe durante 24 h y 450 mg L⁻¹ NPs Fe durante 48 h aumentó la producción de hiosciamina y escopolamina.

Todos los estudios mencionados anteriormente confirman la posibilidad de que las NPs se empleen como inductoras exitosas y prometedoras de compuestos bioactivos en cultivos de células y órganos de plantas. Se necesitan estudios adicionales para evaluar el potencial de obtención de varias otras NPs en la producción de metabolitos secundarios en cultivos de tejidos vegetales y los mecanismos correspondientes.

Entrada de nanopartículas para desinfección superficial de explantes.

La contaminación microbiana es un problema grave cuando se trata del cultivo de tejidos vegetales. La misma puede extinguir todo el proceso y la eficiencia del sistema de propagación incluso antes de la inicialización. Los explantes y el entorno de laboratorio utilizado son las fuentes de contaminantes. Por lo general, los diversos órganos recolectados de plantas cultivadas en el campo o en el invernadero se esterilizan en la superficie antes del establecimiento de cultivos *in vitro*. Sin embargo, en muchos casos, esto ha resultado ser inadecuado y, por lo tanto, muchos experimentos se han arruinado, lo que ha llevado a una pérdida de mano de obra y tiempo (Kim *et al.*, 2017).

La desinfección de la superficie de los explantes es un paso importante antes del inicio del cultivo *in vitro* porque los microorganismos crecen más rápido en el medio de cultivo de tejidos que los explantes, y pueden afectar seriamente el inicio del cultivo. Varios agentes esterilizantes, como bromo, agua (BW), hipoclorito de calcio (CaClO), etanol (EtOH), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), hipoclorito de sodio (NaClO), cloruro de mercurio (HgCl₂), nitrato de plata (AgNO₃), antibióticos y fungicidas están en uso para obtener explantes estériles.

Según Kim *et al.* (2017) la concentración de los desinfectantes y el tiempo de exposición a menudo afectan la calidad de los explantes. Además, la eliminación de bacterias endógenas es a menudo muy desafiante y, por lo tanto, se incluyen varios antibióticos y nitrato de plata (AgNO₃) en el medio de cultivo para matar a las bacterias o prevenir el crecimiento bacteriano. Sin embargo, se ha reportado que los antibióticos generan fitotoxicidad en las células, tejidos y cultivo de órganos en diversas especies de plantas. Algunos agentes desinfectantes incluso no han logrado eliminar los contaminantes en los explantes y en su lugar, han afectado profundamente la organogénesis debido a su fitotoxicidad.

Se demostró que las NPs de metales y de óxidos metálicos son útiles para la eliminación de diversos microorganismos. Una amplia gama de NPs como la plata (Ag), el óxido de aluminio (Al₂O₃), óxido de cobre (CuO), el óxido de hierro (Fe₃O₄), el oro (Au), el óxido de magnesio (MgO), el níquel (Ni), el silicio (Si), el óxido de silicio (SiO₂), el óxido de titanio (TiO₂) y el óxido de zinc (ZnO) poseen actividades antimicrobianas contra diversos microorganismos (Kokina y Plaksenkova, 2022).

La propiedad antibacteriana de las NPs no es un tema nuevo; es uno de los logros más establecidos y mejor estudiados de las nanotecnologías, siendo los más famosos las NPs de Ag, TiO₂ y de ZnO. La efectividad de las NPs en la eliminación de contaminantes microbianos en cultivos de tejidos de plantas depende de sus dimensiones, tamaño, distribución y tipo.

Aplicación y efectos de las nanopartículas de plata

Siddiqui *et al.* (2015) estudiaron los efectos de la síntesis biológica de las nanos de plata en crecimiento de *Bacopa monnieri*, y demostraron que esa síntesis tuvo efecto sobre la germinación *in vitro* de semillas y en la inducción de proteína y carbohidratos y la disminución del contenido total de fenol y la actividad de la peroxidasa. Las nanos de plata incrementaron el perfil de crecimiento (longitud de las raíces, área foliar) y los atributos bioquímicos (clorofila, carbohidratos

y contenido de proteínas, enzimas antioxidantes) de *Brassica juncea*, frijol común (*Phaseolus vulgaris*) y maíz (*Zea mays*). También, Gruyer *et al.* (2014) informaron que las nanos de plata tuvieron efecto positivos y negativos en la elongación de las raíces dependiendo de la especie. Mientras que la longitud de las raíces fue incrementada en la cebada (*Hordeum vulgare*), pero fue inhibida en la lechuga (*Lactuca sativa*).

Además, Syu *et al.* (2014) señalaron los efectos de tres morfologías diferentes de las NPs Ag, incluidos los decaédricos (45 ± 5 nm), esféricos (8 ± 2 nm) y triangulares (47 ± 7 nm), sobre el crecimiento de las plántulas, la expresión génica y los cambios fisiológicos en *Arabidopsis*. El crecimiento de la raíz mejoró cuando las plántulas se trataron con NPs Ag ya sea triangulares o decaédricas, mientras que no se detectó después del tratamiento esférico de NPs Ag. Se informó que el tratamiento con NPs Ag altera el contenido de enzimas antioxidantes y la expresión de genes que están involucrados en la biosíntesis de auxina, ácido abscísico y etileno.

También, Kim *et al.* (2017) emplearon nanopartículas de plata (NPs Ag), para controlar la contaminación bacteriana en *Valeriana officinalis*. Los explantes de un solo nudo obtenidos de plantas cultivadas en invernadero se desinfectaron superficialmente con EtOH al 70% durante 1 min, Clorox al 10% durante 1 min y luego 100 mg L⁻¹ de NPs Ag durante 180 min; este proceso resultó en 89% de cultivos libres de contaminación. Además, el tratamiento con NPs Ag no afectó la multiplicación de brotes *in vitro* y el posterior enraizamiento. De manera similar, el tratamiento del capullos inmaduros de *Gerbera jamesonii* con 1,5% de NaOCl durante 10 minutos y 200 mg L⁻¹ NPs Ag durante 15 minutos eliminó todos los contaminantes y no mostró efectos adversos en la organogénesis. Explantes de hoja de *Vitis vinifera* cultivares "Farkhi", "Khoshnave" y "Rashe" fueron descontaminados con éxito con 95% de EtOH durante 30 s, y 1000 mg L⁻¹ NPs Ag durante 20 min.

Al respecto, Mahna *et al.* (2013) refirieron al efecto del tratamiento con NPs Ag en la desinfección de la superficie de semillas de *Arabidopsis*, hojas de papa (*Solanum tuberosum* L.) y cotiledones de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Estos autores señalaron que el tratamiento de los explantes con 100 mg L⁻¹ NPs Ag durante 1 o 5 min fue ideal para descontaminar (100%) las semillas, hojas o cotiledones, y este tratamiento no tuvo efectos secundarios en la viabilidad del explante. Sin embargo, la germinación de las semillas y la supervivencia de las hojas y los cotiledones se redujeron cuando se trataron con concentraciones más altas de NPs Ag.

La eliminación de microorganismos en cultivos *in vitro* es un gran desafío cuando se trata de plantas leñosas. Los meristemos y brotes obtenidos de plantas de olivo (*Olea europea* L.) de 9 años de edad se trataron con EtOH al 70% durante 1 min, seguido de Clorox al 10% durante 10 min, y esto produjo un 51,4% de cultivo sin contaminación. El tratamiento de los explantes en 100 mg L⁻¹ NPs Ag durante 60 minutos después de la exposición a EtOH y Clorox evitó completamente la contaminación, pero solo supervivieron unos pocos explantes *in vitro*.

Por otro lado, el empleo de NPs Ag (4 mg L⁻¹) en el medio de cultivo controló adecuadamente los contaminantes internos en los explantes de olivo (*Olea europea* L.) y no se observaron efectos negativos en los explantes y su crecimiento (Rostami y Shamsavar, 2009). También, Sarmast *et al.* (2011) informaron que la esterilización de explantes de *Araucaria excelsa* seguida de una inmersión en 200 mg L⁻¹ de NPs Ag durante 180 min redujo la tasa de contaminación del 61,5 al

11,3%. La inclusión de 400 mg L⁻¹ de NPs Ag en el medio de cultivo redujo la contaminación de 81,25 a 18,75%. De manera similar, la aplicación de 100 y 150 mg L⁻¹ NPs Ag, tanto por inmersión como por adición al medio MS, redujo significativamente la contaminación interna y externa en portainjertos de GN15 (Garfi x Nemared' (*Prunus dulcis* (Mill) D.A.Webb x *Prunus persica* L. Batsch.))

Además, Kim *et al.* (2012) utilizaron diferentes nanopartículas de plata para lograr la desinfección en diferentes medios de cultivo. Los medios de cultivo fueron tratados con diferentes concentraciones (10, 25, 50 y 100 mg L⁻¹) de nanos de plata en placas de Petri. El medio de cultivo con las NPs Ag fue incubado a temperatura ambiente. Después de 48 horas de incubación tapones de agar que contenían hongos fueron inoculados simultáneamente en cada placa de Petri que contenía nanos de plata seguida por una incubación por 14 días. En la mayoría de los casos la mayor inhibición de crecimiento fúngico fue registrada en el tratamiento con 100 mg L⁻¹. La mayoría de los hongos mostraron inhibición de crecimiento con el incremento del tiempo de incubación, y la inhibición mostro patrones similares para cada tipo de medio de cultivo.

También, Spinoso-Castillo *et al.* (2017) informaron sobre el efecto antimicrobiano y hormético de nanopartículas de plata en la multiplicación *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia*) usando Sistemas de Inmersión Temporal, a los que se les adicionó el nanoproducto Agrovit-CP®. Se le añadió al medio de cultivo cinco concentraciones del nanoproducto 0, 25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹ durante 25 días. Respecto a la contaminación se logró un control de bacterias y hongos ya que los tratamientos con 50, 100 y 200 mg L⁻¹ no se observó contaminación mientras en los tratamientos 0 y 25 mg L⁻¹ se obtuvieron porcentajes de 16,66 y 8,33% de contaminación respectivamente. En cuanto al efecto horméticos, el mayor número de brotes *in vitro* se obtuvo en medio de cultivo con 25 o 50 mg L⁻¹ NPs Ag, con valores de 14,33 y 14,89 respectivamente, mientras que el número más bajo de brotes (4,55) se observó en medio de cultivo MS con 200 mg L⁻¹ de NPs Ag. También, es esta especie Pastelín-Solano *et al.* (2020) señalaron el efecto positivo de esta NPs en la propagación *in vitro* vía organogénesis. Los resultados sugirieron que el uso de NPs Ag puede ser una alternativa eficaz para reducir la contaminación durante el establecimiento *in vitro* y promover el desarrollo durante la propagación de *V. planifolia in vitro*.

Según informaron Cabrera y Iván (2018) al realizar un estudio con 4 concentraciones de NPs Ag en medio de cultivo MS, en la fase de establecimiento *in vitro* en mora de castilla (*Rubus glaucus*) para determinar el efecto antimicrobiano de las NPs Ag. También, se evaluó el efecto hormético en las tres fases de la propagación *in vitro* vía organogénesis, establecimiento, multiplicación y enraizamiento. Las concentraciones fueron: 0, 25, 50, 75, 100 mg L⁻¹; en un medio de cultivo MS al 50% de concentración de sus sales y vitaminas, con 0,5 mg L⁻¹ de 6-BAP, 0,1 mg L⁻¹ de ácidoindol-3-acético (AIA), 15 g L⁻¹ de sacarosa y 0,6% de agar agar, con pH de 5,8 y tratamiento en autoclave durante 15 min. Primero se esterilizó en autoclave el medio de cultivo y se dejó enfriar en la cámara de flujo laminar a 75-80°C. Posteriormente se colocaron las nanos de plata. Las variables que se evaluaron fueron: porcentaje y presencia de la contaminación en el medio de cultivo, porcentaje y presencia de fenoles en el medio de cultivo, numero de brotes, altura de brotes y numero de hojas. Cada variable fue medida 20 días de cultivo.

En la fase de establecimiento no se registró contaminación por microorganismos en los tratamientos con 50, 75 y 100 mg L⁻¹, mientras que los tratamientos con 0 y 25 mg L⁻¹ se observó una contaminación del 80% y del 40 % respectivamente. En cuanto a la contaminación en la fase de multiplicación se obtuvo que en los tratamientos con 50, 75 y 100 mg L⁻¹ no presentaron microorganismos, mientras que los tratamientos con 0 y 25 mg L⁻¹ registraron 66% y 20% respectivamente de contaminación. En la fase de enraizamiento no se presentó contaminación en los tratamientos con 50, 75 y 100 mg L⁻¹, mientras que los tratamientos con 0 y 25 mg L⁻¹ presentaron 40% y 20 % de contaminación respectivamente (Cabrera y Iván, 2018).

El efecto hormético fue evaluado en la fase de establecimiento a los 20 días después de colocados en el medio de cultivo los explantes. El tratamiento con 25 mg L⁻¹ fue el que presentó los mayores valores en el desarrollo de brotes *in vitro* con 2,2 por microestaca, con una altura del primer y segundo brotes de 2,30 cm y 1,60 cm respectivamente. Además, presentó el mayor número de hojas con 5,6 del primer brote y 4 del segundo. Mientras que el tratamiento sin NPs Ag desarrolló 1,4 brotes por explante, con una altura del primer brote de 1,08 cm y del segundo brote de 0,30 cm; con un número de hojas del primer y segundo brote de 2,2 y 0,8.

En la fase de multiplicación a los 90 días de cultivo el efecto hormético fue también evaluado. El tratamiento con 25 mg L⁻¹ presentó un mayor factor de multiplicación de 2,60±1,3 brotes *in vitro* por brotes principal, con una altura del brote principal de 4,02 cm, sin presentar diferencias significativas con los otros tratamientos. El tratamiento sin NPs presentó los valores más bajos de las variables analizadas con un coeficiente de multiplicación de 0,20 brotes; una altura del brote principal de 2,64 cm y un número de hojas de 1,20 (Cabrera y Iván, 2018).

El efecto hormético en la fase de enraizamiento fue evaluado a los 45 días después del trasplante del brote *in vitro* resultado de la fase de multiplicación. El tratamiento con 25 mg L⁻¹ presentó valores más altos: 2,82 cm de altura; 23,40 en número de hojas; 3,40 en número de raíces y 3,38 cm en la longitud de la primera raíz funcional. Los valores más bajos en el desarrollo de los brotes se observaron en el tratamiento con 0 mg L⁻¹, con una altura de 2,12 cm, número de hojas de 15,20, número de raíces de 1,60 y una longitud de la primera raíz de 1,52 cm. En los tratamientos con 25 y 50 mg L⁻¹ se evidenció un 60% más de enraizamiento en comparación con el control.

La oxidación fenólica en el medio de cultivo fue evaluada en la fase de establecimiento a los 20 días de cultivo. Se evidenció una inhibición en el medio de cultivo de los tratamientos con 50, 75 y 100 mg L⁻¹ de NPs Ag. A diferencia el tratamiento con 0 mg L⁻¹ mostró oxidación de los fenoles en el 100% de los envases evaluados, con un alo en el medio de cultivo de 18 cm². También, en el tratamiento con 25 mg L⁻¹ alcanzó una fenolización del 40% de los frascos de cultivo con un alo menor del 33% de la superficie de los mismos. La fenolización en la fase de enraizamiento, fue evaluada a los 45 días después del trasplante de los brotes. Los tratamientos con 25, 50, 75 y 100 mg L⁻¹ no presentaron fenolización mientras que el tratamiento con 0 mg L⁻¹ presentó un 20%.

Además, se determinaron las clorofilas a, b y total en la fase de multiplicación y enraizamiento. Los tratamientos con 50, 75 y 100 mg L⁻¹ presentaron los mayores contenidos de clorofila, destacándose el tratamiento con 50 mg L⁻¹ con 34,36 µg ml⁻¹ de clorofila a, 27,53 µg ml⁻¹ de clorofila b y 61,79 µg.ml⁻¹ de clorofila total. Mientras que el tratamiento con 0 mg L⁻¹ obtuvo los

contenidos más bajos de clorofila con 23,14 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de clorofila a, 13,39 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de clorofila b y 36,53 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de clorofila total. Los tratamientos con 50, 75 y 100 mg L^{-1} en la fase de enraizamiento presentaron los mayores contenidos de clorofilas, destacándose el tratamiento con 50 mg L^{-1} con 35,89 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de clorofila a, 34,98 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de b y 70,86 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de clorofila total. Sin embargo, el tratamiento con 0 mg L^{-1} obtuvo los contenidos más bajos con 16,58 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de clorofila a, 10,15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de clorofila b y 26,73 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de clorofila total.

Por su parte, Zuverza-Mena *et al.* (2016) estudiaron los efectos de las nanos de plata en los brotes *in vitro* de rábano (*Raphanus sativus* L.) crecimiento de raíces, reducción y modificación en el valor nutritivo. Se cultivaron 30 semillas previamente desinfectadas y colocadas en placa de Petri sobre papel de filtro para su germinación. Los tratamientos consistieron en las siguientes concentraciones: 0 (control), 125, 250 y 500 mg L^{-1} de NPs. Se calculó el porcentaje de germinación, germinación relativa y variación de la germinación. La longitud de la raíz, de los brotes, el contenido de agua, así como el peso de la masa fresca y seca fue determinada en 15 plantas por tratamiento. El tratamiento con 125 mg L^{-1} incrementó un 3% la germinación, mientras que el tratamiento con 250 y 500 mg L^{-1} redujeron la germinación entre un 3 y 6% respectivamente. Sin embargo, ningún tratamiento mostró diferencias significativas respecto al control.

Además, la longitud de la raíz de las semillas expuestas al tratamiento con 500 mg L^{-1} (5,2 cm) fue más corta comparada con la longitud de la raíz del tratamiento con 250 mg L^{-1} (7,2 cm) con diferencias significativas. En cuanto a la elongación de los brotes, las concentraciones de nano redujeron significativamente la elongación de los mismos. En cuanto a la masa seca, las plantas en el tratamiento con 250 mg L^{-1} presentaron menos biomasa comparadas con los otros tratamientos y el control. La reducción fue en 10% comparado con el control, y alrededor de 7% comparada con los otros tratamientos. El contenido de agua se vio reducido comparado con el control. En este caso las diferencias fueron estadísticamente significativas comparadas con el control; sin embargo, no se encontró diferencias entre los tratamientos con 250 y 500 mg L^{-1} .

También, Timoteo *et al.* (2019) señalaron el efecto de las nanopartículas de plata en la micropropagación de *Campomanesia rufa* (O.Berg) Nied. Para el estudio se tomaron yemas (4 cm), las cuales fueron transferidas al medio de cultivo MS con 5,62 μM 6-BAP y 30 g L^{-1} de sacarosa. El medio de cultivo fue suplementado con diferentes concentraciones de las nanos de plata (0,0; 0,38; 0,77; 1,54 y 15,4 mg L^{-1}) o nitrato de plata a concentración de 0,18 g L^{-1} , con lo que corresponde a la misma concentración usada para la síntesis de la solución de las nanos de plata utilizada para el estudio. También, se utilizó Agar 7,0 g L^{-1} y el pH ajustado a 5,7, antes de la esterilización en autoclave a 121°C y 1 atmósfera por 20 min.

El cultivo fue mantenido en un cuarto de crecimiento. A los 90 días se determinó el número y la altura de los brotes *in vitro*, la masa fresca total de los brotes. Al realizarse el análisis de presencia de las nanos en el medio de cultivo estas se observaron tanto en la de menor concentración como en el de la mayor, indicando la presencia del ion plata en el medio usado para inducir nuevos brotes de la planta. Los nanos presentes en el medio de cultivo fueron más largas que las nanos en la solución sintetizada. La alta temperatura (121°C) de la esterilización promovió la aglomeración de las nanos, lo cual influyó en el incremento del tamaño de las mismas comparado

con la solución no autoclaveada de las nanos de plata. La exposición de los segmentos nodales a las diferentes concentraciones de nanos no afectó la brotación de las yemas (tratamientos con 0,38; 0,77 y 1,54 mg L⁻¹) comparado con las condiciones del control sin nanos de plata.

Sin embargo, en el tratamiento con 15,4 mg L⁻¹ y el tratamiento de nitrato de plata se observó una reducción de aproximadamente 90% en el número de nuevos brotes. Consecuentemente con el número de brotes el total de masa fresca también se redujo un aproximado de 80% en el tratamiento con 15,4 mg L⁻¹ y el tratamiento de nitrato de plata comparado con el control. No obstante, la longitud de los brotes obtenidos no fue influenciada con la exposición a las nanos de plata.

Al respecto, Bello-Bello *et al.* (2017) evaluaron la respuesta hormético por las nanopartículas de plata en la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) usando Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), empleando el nanoproducto Agrovit-CP®. Los brotes *in vitro* de 3 cm de largo, después de 3 subcultivos cada 30 días fueron usados como explantes. Se tomaron 10 explantes de 2 brotes *in vitro* cada uno, los cuales fueron colocados en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) de 1 litro conteniendo 500 mL de medio de cultivo MS suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 1,0 mg L⁻¹ de kinetina, 0,6 mg L⁻¹ de AIA y 0,3 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP). El medio de cultivo se esterilizó en autoclave por 15 min a 120°C. Después de la esterilización se les añadió las nanos de plata con las siguientes concentraciones: 0, 25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹. Para cada tratamiento fueron utilizadas 3 BIT, el experimento tuvo tres repeticiones. Después de 30 días de incubación el número y longitud de brotes por explantes fueron tomados.

El mayor número de brotes y longitudes fueron obtenidos en el tratamiento con 50 mg L⁻¹ (número de brotes de 47,28 ±1,69 y la longitud de 5,55± 0.24 cm) y en el tratamiento con 100 mg L⁻¹ (número de brotes de 44,90 ±1,69 y la longitud de 5,41±0,25 cm), el tratamiento con 25 mg L⁻¹ (número de brotes de 38,90±1,61y longitud de 4,31±0,25 cm) no tuvo efecto en las variables evaluadas, por otro lado el tratamiento con 200 mg L⁻¹ (número de brotes de 31,97±1,30 y longitud de 2,62±0,23 cm) causó una reducción en la longitud y números de brotes *in vitro*. Con respecto al contenido total de fenoles se observó el aumento de los mismos en el tratamiento con 50 mg L⁻¹ de nanos de plata.

También, Hernández-León *et al.* (2022) en caña de azúcar cv. C97-445 estudiaron cuatro concentraciones de nanopartículas de plata 9,31; 18,63, 27,95 y 37,27 mg L⁻¹ solas y en combinación con la auxina AIA. La densidad de inóculo fue de 15 brotes *in vitro*, en frascos de cultivo plásticos con 80 mL de medio de cultivo semisólido. Las concentraciones de 9,31; 18,63 y 27,95 mg L⁻¹ NPs-Ag en combinación con la auxina AIA alcanzaron un 100 % de enraizamiento de los brotes *in vitro*, excepto en la mayor concentración (37,27 mg L⁻¹), en la que se redujo este valor cerca del 20%. Sin embargo, con la concentración de 27,95 mg L⁻¹ de NPs-Ag, sin la presencia del regulador del crecimiento, se obtuvo un 100 % de plantas con raíces. Las NPs-Ag evitaron la presencia de contaminantes microbianos del tipo bacterias en el medio de cultivo.

Toxicidad y bioseguridad con el uso se las NPs

No hay duda de que los nanomateriales tienen una promesa diversa y se ha demostrado que tienen un potencial excepcional. Sin embargo, trabajar con componentes invisibles se hace más

desafiante. La nanotoxicología es una rama de la alimentación que ha evolucionado para registrar los aspectos negativos de los nanomateriales. Debido a los efectos de tamaño cuántico y su gran área de superficie a relación de volumen, los nanomateriales tienen propiedades únicas en comparación con sus contrapartes más grandes; una de estas propiedades únicas es una característica toxicológica adicional que los nanomateriales pueden poseer, a diferencia de sus materiales a granel correspondientes. Los nanomateriales, incluso cuando están hechos de elementos inertes como el oro, se vuelven altamente activos en las dimensiones nanométricas. Los estudios nanotoxicológicos determinan si y hasta qué punto estas propiedades pueden representar una amenaza para el medio ambiente y para los seres humanos (Ávalos *et al.*, 2013).

Los investigadores han examinado detalladamente los aspectos de toxicidad de los nanomateriales en las plantas. Sugieren que los nanomateriales agregados al medio de cultivo pueden conducir a efectos significativos y adversos en la viabilidad celular, la organogénesis, el crecimiento de brotes, la germinación de semillas, el desarrollo de plántulas y la explantación, así como su supervivencia. Se cree que la fitotoxicidad de los nanomateriales depende de su composición química, concentración, tamaño, estabilidad y tipo (Ávalos *et al.*, 2013), la composición del medio de cultivo, el método de aplicación y el tipo de explante y las especies de plantas.

Según informaron Favez *et al.* (2017) la germinación *in vitro* de semillas y el crecimiento de las plantas *in vitro* de alfalfa (*Medicago sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), maíz, arroz (*Oryza sativa*), tomate y trigo (*Triticum aestivum L*) se vieron afectados negativamente por altas concentraciones de nanomateriales de carbono y NPs de metal. La adición de NPs a la suspensión celular redujo la viabilidad de las células en alterar la expresión del ácido nucleico, inducir daños en el ADN, aumentar la producción de ROS, alterar la síntesis de clorofila, inducir daños en la membrana celular e inducir fugas de electrolitos. Hasta la fecha, no se ha evaluado ni documentado la absorción de NPs en las plantas. Los informes de investigación registran sus conclusiones basadas en la adición de una amplia gama de concentraciones al medio de crecimiento para investigar la fitotoxicidad de varios nanomateriales. Se ha informado que la absorción de NPs por los cultivos de células, tejidos y órganos de las plantas está estrechamente relacionada con la absorción de la humedad y los nutrientes del medio.

Investigaciones realizadas sugieren que existen diversas propiedades físico-químicas de las NPsAg que están involucradas en su toxicidad intrínseca, como son principalmente el tamaño, la superficie específica, estado de aglomeración, la forma, la solubilidad y la carga superficial (Horie *et al.*, 2012). El tamaño es una de las propiedades más importantes de las NPs. Muchas publicaciones han mostrado que la toxicidad de las NPsAg depende del tamaño (Choi y Hu, 2008). Además, el tamaño de las NPsAg también influye en la distribución tisular (De Jong *et al.*, 2008), en la penetración dermal e intestinal (Savage *et al.*, 2007) y en la captación celular (Chithrani *et al.*, 2006). En general, mayores efectos tóxicos han sido observados con las NPsAg más pequeñas.

El tamaño y la superficie específica de las NPs están en estrecha relación, ya que conforme disminuye el tamaño de las NPsAg la superficie específica aumenta dejando un mayor número de átomos expuestos en la superficie, que estarán disponibles para las reacciones redox,

reacciones fotoquímicas y para interacciones físico-químicas con las células. Además, puede fomentar la disolución de los materiales, y por tanto dar lugar a liberación de iones plata (Ag^+), que son potencialmente tóxicos (Asharani *et al.*, 2009; Kittler *et al.*, 2010). El área superficial también influye en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). Por ejemplo, con la misma concentración de NPsAg, de un tamaño de 15 nm produjeron mayores niveles de EROs en macrófagos que NPsAg de 30 y 50 nm (Carlson *et al.*, 2008).

En cuanto al estado de aglomeración la estabilidad de las NPsAg también influye en la toxicidad. Las NPs tienen una tendencia natural a formar aglomerados o agregados (Oberdorster *et al.*, 2005). Los aglomerados son grupos de partículas unidas mediante fuerzas relativamente débiles de tipo van der Waals, electroestáticas o de tensión superficial, que pueden redispersarse por medios mecánicos. Mientras que los agregados son grupos de partículas fuertemente asociadas cuya redispersión por medios mecánicos no resulta fácil. Estos dos fenómenos pueden cambiar el lugar de depósito de las NPsAg en el organismo, ya que un agregado o aglomerado de NPs se deposita en unas zonas u otras debido al distinto diámetro hidrodinámico. Además, también modifica la toxicidad, ya que al ser una estructura relativamente compacta, el área superficial es menor y por tanto la toxicidad también será menor (Gálvez y Tanarro, 2010).

La forma también influye en la toxicidad de las NPs. Se comprobó que las formas de triángulo truncado son más tóxicas que las formas esféricas y alargadas, ya que contienen más caras y por tanto son más reactivas (Pal *et al.*, 2007). Siendo las esféricas las que presentan menor toxicidad. La solubilidad en fluidos biológicos (diferentes pH, o presencia de sales) es otro parámetro importante. Cuando las NPs se disuelven pierden su estructura de NPs y las propiedades toxicológicas específicas de estas, siguiendo entonces consideraciones toxicológicas similares a las de otro contaminante con efectos sistémicos (Gálvez y Tanarro, 2010). La liberación de Ag^+ a partir de las NPsAg requiere más investigaciones, ya que todavía es difícil de interpretar si la toxicidad observada de las NPsAg se debe a las propias NPs o es debido a la liberación de iones Ag^+ .

Al respecto, Luoma (2008) sugirió que tras la ingestión de plata (no específicamente NPs) es probable que se convierta en la forma iónica. Existen estudios donde se han observado una correlación directa entre la carga superficial y la toxicidad de las NPsAg. También, El Badawy *et al.* (2011) observaron que las NPsAg estabilizadas con citrato con cargas superficiales negativas fueron menos citotóxicas que las NPsAg con cargas superficiales positivas estabilizadas con polietilenimina ramificada.

Con la misma composición química, las NPs presentan diferentes propiedades físico-químicas y estas diferencias son un factor importante para la influencia celular. Por tanto, es importantísimo realizar una caracterización detallada de cada una de las NPs antes de realizar cualquier otro ensayo de toxicidad, con el fin de entender las influencias celulares exactas de cada una de ellas, además de comprender y controlar la síntesis y las aplicaciones de las NPs. La caracterización de las NPs se puede llevar a cabo utilizando una variedad de técnicas como por ejemplo, el microscopio electrónico de transmisión (TEM) (determina el tamaño del núcleo metálico), el

microscopio de fuerza atómica (AFM) (mide el tamaño de la NP y su distribución), el microscopio electrónico de barrido (SEM), y por último, a través de la dispersión de luz dinámica (DLS) (determina el radio hidrodinámico, esto es, el tamaño de la NP, núcleo + corona + capa de disolvente) (Yoosaf *et al.*, 2007).

La composición de las NPs se puede determinar utilizando la espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) (mide el estado de oxidación del elemento metálico), por resonancia magnética nuclear (RMN) (determina la corona orgánica de las NPs), por espectrometría de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (PAI) y por último, por espectrometría de absorción atómica (EAA), (ambas determinan la concentración de metal). Otras técnicas que también se podrían emplear para la caracterización de las NPs son la espectrometría de infrarrojo (IR) y la espectrometría de ultra violeta (UV), entre otras (Liu *et al.*, 2013).

Conclusiones

Según las publicaciones científicas que citan el efecto de las NPs en el cultivo de tejidos vegetales, no hay duda de que éstas tienen mucho que ofrecer en términos de diversos aspectos de la biotecnología de las plantas. Desde la primera fase de la propagación *in vitro*, a través de la desinfección, la multiplicación y enraizamiento hasta la diferenciación del callo, la transformación genética, la variación somaclonal y la producción de metabolitos secundarios, las NPs demuestran su papel positivo. Después de haber presentado el escenario en la actualidad, esto es solo la punta del iceberg; la nanotecnología tiene más que ofrecer, y es hora de explorar y profundizar en los nanorecursos e incorporarlos al cultivo de tejidos vegetales.

La nanobiotecnología es un tema multidisciplinario y ofrece un alcance ilimitado en múltiples áreas. Se informa que una amplia gama de NPs posee una potente actividad antimicrobiana, sin embargo solo unas pocas, como las NPs Ag, NPs TiO₂, NPs Zn y NPs ZnO, se han utilizado predominantemente para controlar los contaminantes microbianos en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Los estudios nanotoxicológicos para determinar hasta qué punto las NPs pueden representar una amenaza para el medio ambiente y los seres humanos ha sido abordado en diferentes publicaciones pero aun es un tema que necesita ser profundizado sobretodo por los altos costos de su realización.

Bibliografía

Alharby, H., Metwali, E., Fuller, M., Aldhebiani, A. (2016). Impact of Application of Zinc Oxide Nanoparticles on Callus Induction, Plant Regeneration, Element Content and Antioxidant Enzyme Activity in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under Salt Stress. Arch. Biol. Sci., 68; 723–735. DOI: <http://dx.doi.org/10.2298/ABS151105017A>.

Anwaar, S., Maqbool, Q., Jabeen, N., Nazar, M., Abbas, F., Nawaz, B., Hussain, T., Hussain, S. Z. (2016). The Effect of Green Synthesized CuO Nanoparticles on Callogenesis and Regeneration of *Oryza sativa* L. Front. Plant Sci. 7; 1-9.

Ardekani, M.R.S., Abdin, M.M.Z., Nazima, A.Z., Nasrulla N.N., Samim, M., Samim, M. (2014). Calcium phosphate nanoparticles a novel nano-viral gene delivery system for genetic transformation of tobacco. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(6); 605-609.

Asharani, P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P., Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.*, 3; 279-290. DOI: <https://doi.org/10.1021/nn800596w>

Ávalos, A., Haza, AI, Mateo, D., Y Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense De Ciencias Veterinarias*, 7(2); 1-23.

Bansod, S., Bawskar, M., Rai. M. (2015). In vitro effect of biogenic silver nanoparticles on sterilisation of tobacco leaf explants and for higher yield of protoplasts. *IET Nanobiotechnology*, 12; 1-7.

Bello-Bello, J., Chavez-Santos, R A., Lecona-Guzmán, C A., Bogdanchikova, N., Salinas-Ruíz, J., Gómez-Merino, F., Pestryakov, A. (2017). Hormetic response by silver nanoparticles on in vitro multiplication of sugarcane (*Saccharum spp. cv. Mex 69-290*) using a Temporary Immersion System. *Dose-Response*, 15(4); 1-9. DOI:<http://dx.doi.org/10.1177/1559325817744945>

Bhat, P. y Bhat, A. (2016). Silver nanoparticles for the enhancement of accumulation of capsaicin in suspension culture of *Capsicum* sp. *Journal of Experimental Sciences*, 7(2); 1-6.

Cabrera, P. e Iván, C. (2018). Estudio del efecto hormético y antimicrobiano de nanoplata en la regeneración in vitro en mora de castilla (*Rubus glaucus*). Universidad de Las Fuerzas Armadas. Quito, Ecuador, pp.56.

Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J.J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B.*, 112; 13608-13619. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp712087m>.

Chamani E, Ghalehtaki, K.S., Mohebodini, M., Ghanbari, A. (2015). The effect of Zinc oxide nano particles and Humic acid on morphological characters and secondary metabolite production in *Lilium ledebourii* Bioss. *Iran J Genet Plant Breed.*, 4(2); 11-19.

Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C.W.(2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake by mammalian cells. *Nano Lett.*, 7; 1542-1550.

Choi, O. y Hu, Z. (2008). Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ Sci Technol.* 42; 4583-4588.

De Jong, W.H., Hagens, W.I., Krystek, P., Burger, M.C., Sips. A.J.A.M., Geertsma, R.E. (2008).

Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*, 29; 1912-1919. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.037>.

Desai, Ch.V., Heta, B., Desai, K.P., Suthar, D., Singh, R.M., Patel A., Taslim, A. (2015). Phytotoxicity of zinc-nanoparticles and its influence on stevioside production in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Biological Research*, 17 (1); 1-7.

El Badawy, A.M., Silva, R.G., Morris, B., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., Tolaymat, T.M.(2011). Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 45(1); 283-287.

Ewais, E.A., Said, A. Desouky, E., Elshazly, H. (2015). Evaluation of Callus Responses of *Solanum nigrum* L. Exposed to Biologically Synthesized Silver Nanoparticles *Nanoscience and Nanotechnology*, 5(3); 45-56.

Fayez, K. A., El-Deeb, B. A., Mostafa, N. Y. (2017). Toxicity of biosynthetic silver nanoparticles on the growth, cell ultrastructure and physiological activities of barley plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(7); 12-18. DOI:<http://dx.doi.org/10.1007/S11738-017-2452-3>

Fazal, H., Abbasi, B.H., Ahmad, N., Ali, M. (2016). Elicitation of medicinally important antioxidant secondary metabolites with Silver and Gold nanoparticles in callus cultures of *Prunella vulgaris* L. *Appl Biochem Biotechnol.*, 180(6); 1076-1092. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-016-2153-1>.

Gálvez, V. y Tanarro, C. (2010). Toxicología de las nanopartículas. *Seguridad y salud en el trabajo.*, 56; 6-12.

Genady, E.A., Ebtessam, A.Q. y Fahmy, A.H.(2016). Copper Sulfate Nanoparticles In vitro Applications on *Verbena bipinnatifida* Nutt. Stimulating Growth and Total Phenolic Content Increasments. *Int.J. Pharm. Res. Allied Sci.*, 5(1); 196-202.

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

Gruyer, N., Dorais, M., Bastien, C., Dassylva, N., Triffault-Bouchet, G. (2014). Interaction between silver nanoparticles and plant growth. *Acta Horticulturae*, 1037; 795-800. DOI: <http://dx.doi.org/10.17660/Actahortic.2014.1037.105>

Hashim, K. M-A. y Aseel Salih, M-A. (2014). The effect of (AgNO₃) NPs on increasing of secondary metabolites of *Calendula officinalis* L. in vitro . *International Journal of Pharmacy & Therapeutics*, 5(4); 267-272.

Helaly, M. N., El-Metwally, M. A., El-Hoseiny, H., Omar, S.A., El-Sheery. N. I. (2014). Effect of nanoparticles on biological contamination of in vitro cultures and organogenic regeneration of

banana. Australian Journal of Crop Science, 8(4); 612-624.

Hernández-León, MC., Gómez-Kosky, R., Toledo-Rodríguez, E.A., Bernal-Villegas, A., Alejo-Sierra, M., Álvarez-Ferreiro, J., Aguiar-Fernández, A.T., Bermúdez-Calimano, M., Valdés-Martínez, A., González-Alfaro, Y. (2022). Efecto de las nanopartículas de plata (NPs-Ag) en el enraizamiento in vitro de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Icidca sobre los derivados de la caña de azúcar, 56(3); 24-31.

Holghoomi, R. y Colagar, A.H.(2024). Applications of Biocompatible Nanoparticles in Plant Biotechnology for Enhanced Secondary Metabolite Biosynthesis. DOI: <http://dx.doi.org/10.22541/au.171026632.22580341/v1>

Horie, M., Kato, H., Fujita, K., Endoh, S., Iwahashi, H. (2012). In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. Chem Res Toxicol. 25; 605-619. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx200470e>.

Kim, D. H., Gopal, J., Sivanesan, I. (2017). Nanomaterials In Plant Tissue Culture: The Disclosed And Undisclosed. RSC Advances,7(58); 36492-36505. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C7ra07025j>

Kim, S. W., Jung, J. H., Lamsal, K., Kim, Y. Seok, M., Ji, S., Lee Y., Youn, S. (2012). Antifungal Effects Of Silver Nanoparticles (AgNps) Against Various Plant Pathogenic Fungi. Mycobiology, 40(1); 53-58. DOI: <http://dx.doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.053>

Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Köller, M., Epple, M. (2010). Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. Chem. Mater., 22; 4548-4554. DOI: <https://doi.org/10.1021/cm100023p>.

Kokina, I. y Plaksenkova, I.(2022). Nanoparticles in Plant Biotechnology: Achievements and future challenges. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B, 76 (2); 204–210.

Kokina, I., Gerbreders, V., Sļedevskis, E., Bulanovs, A. (2013). Penetration of nanoparticles in flax (*Linum usitatissimum* L.) calli and regenerants. J. Biotechnol., 165 (2); 127–132.

Kokina, I., Jahundovièa, I., Mickevièa, I., Jermaionoka, M., Strautiòð, J., Popovs, S., Ogurcovs, A., Sļedevskis, E., Polyakov, B., Gerbreders, V. (2017). Target transportation of auxin on mesoporous Au/SiO₂ nanoparticles as a method for somaclonal variation increasing in flax (*L. usitatissimum* L.). J. Nanomater., 7143269.

Kumar, V., Guleria, P., Kumar, V., Yadav, S.K. (2013). Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana*. Science of The Total Environment., 461–462; 462-468.

Liu, H., Ma, Ch., Che, G., White, J.C., Wang, Z., Xing, B., Dhankhe, O.P. (2017). Titanium Dioxide nanoparticles alleviate tetracycline toxicity to *Arabidopsis thaliana* (L.) ACS Sustainable Chemistry

& Engineering, 5(4); 25-32.

Liu, S., Yuzvinsky, T.D., Schmidt, H. (2013). Effect of fabrication-dependent shape and composition of solid-state nanopores on single nanoparticles detection. ACS Nano, 7; 5621-5627. doi: 10.1021/nn4020642.

Luoma, S.N. (2008). Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges. The Pew Charitable Trusts and the Woodrow Wilson International Center for Scholars. One Woodrow Wilson Plaza 1300 Pennsylvania Ave. N.W. Washington.

Mahna, N., Vahed, S. Z., Khani, Y.S. (2013). Plant in vitro culture goes Nano: Nanosilver-mediated decontamination of ex vitro explants. Journal Of Nanomedicine And Nanotechnology, 4(2); 3-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7439.1000161>

Moharrami, F., Hosseini, B., Sharafi, A., Farjaminezhad, M. (2017). Enhanced production of hyoscyamine and scopolamine from genetically transformed root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L. elicited by iron oxide nanoparticles. In Vitro Cell. Dev. Biol.: Plant, 53; 104–111.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum 15; 473-497.

Naqvi, S., Maitra, A.N., Abdin, M.Z., Akmaland, Md., Samim, Md.(2012). Calcium phosphate nanoparticle mediated genetic transformation in plants. Journal Materials. Chem., 20; 1–9.

Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ Health Perspect., 113; 823- 839.

Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol., 73; 1712-1720.

Pastelín-Solano, M.C., Ramírez-Mosqueda, M.A., Bogdanchikova, N., Castro-González, C.G., Bello-Bello, J.J. (2020). Las nanopartículas de plata afectan la micropropagación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) Agrociencia 54; 1-13.

Pasupathy, K., Lin, S., Hu, Q., Luo, H., Ke, P. C. (2008). Direct plant gene delivery with a poly (amidoamine) dendrimer. Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology, 3(8); 1078-1082.

Poborilova, Z., Radka, O., Babula, P. (2013). Toxicity of aluminium oxide nanoparticles demonstrated using a BY-2 plant cell suspension culture model. Environmental and Experimental Botany 91; 1–11.

Rai, M., Kon, K., Ingle, A., Duran, N., Galdiero, S., Galdiero, M.(2014). Broad-spectrum

bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,98; 951–1961.

Rostami, A.A. y Shahsavari, A. (2009). Nano-Silver particles eliminate the in vitro contaminations of olive 'Mission' explants. *Asian Journal of Plant Sciences*, 51 (1); 1-5.

Sarmast, M.K. y Salehi, H. (2016). Silver nanoparticles: an influential element in plant nanobiotechnology. *Molecular Biotechnology*, 58; 441-449.

Sarmast, M.K., Salehi, H., Khosh-Khui, M. (2011). Nano silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of *Araucaria excelsa* R. Br. var. 'Glauca' explants. *Acta Biologica Hungarica*, 62(4); 477–484.

Savage, N., Thomas, T.A., Duncan, J.S. (2007). Nanotechnology applications and implications research supported by the US Environmental Protection Agency STAR grants program. *J Environ Monit.*, 9; 1046-1054.

Shakeran, Z., Keyhanfar, M., Asghari, G., Ghanadian, M. (2015). Improvement of atropine production by different biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Datura metel*. *Turkish J Biol.*, 39(1); 111–118. DOI: <https://doi.org/10.3906/biy-1405-25>

Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Mohammad, Y.F. (2015). Nanotechnology And Plant Sciences: Nanoparticles And Their Impact On Plants. *Nanotechnology And Plant Sciences*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0>

Soumya, D., Delvadiya, I.R., Murakonda Sai Dinesh¹ and Ginoya A.V. (2023). Nanotechnology Enabled Advancements in Plant Breeding. *Biological Forum – An International Journal* 15(5); 585-592.

Spinoso-Castillo, J.L., Chavez-Santoscoy, R.A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J.A., Morales-Ramos, V., Bello-Bello, J.J. (2017). Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a Temporary Immersion System. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture*, 129(2); 195-207. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/S11240-017-1169-8>

Syu, Y., Hung, J. H., Chen, J. C., Chuang, Y. H. (2014). Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression *Physiol. Plant Biochem.*, 83; 57–64.

Talankova-Sereda, T.E., Liapina, K.V., Shkopinskij, E. A., Ustinov, A.I., Kovalyova, A.V., Dulnev P.G., Kucenko, N.I. (2016). The Influence of Cu and Co Nanoparticles on Growth Characteristics and Biochemical Structure of *Mentha longifolia* in vitro. *Nanoscience and Nanoengineering*, 4(2); 31-39.

Thorpe, T. (2014). History of Plant Tissue Culture. Methods in Molecular Biology, En: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F (Eds) Plant Cell Culture Protocols, Second Edition, Totowa, 411 pp.

Timoteo, C. DeO., Paiva, R., Dos, R., Valquíria, M., Claro, P., Cunha I., Da Silva, D. P., Corrêa, M. JM., De Oliveira, J.E. (2019). Silver Nanoparticles in the micropropagation of *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied. Plant Cell, Tissue And Organ Culture, 137(2); 359-368. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/S11240-019-01576-9>

Torney, F., Trewyn, B.G., Lin, VS-Y., Wang, K.(2007). Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. Nat Nanotechnol.,2(5); 295-299.

Vasyukova, I., Gusev, A., Zakharova, O., Baranchikov, P., Yevtushenko, N.(2021). Silver nanoparticles for enhancing the efficiency of micropropagation of gray poplar (*Populus × canescens* Aiton. Sm.) IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 875; 012053 DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/875/1/012053>

Vijayakumar, S., Othalathara,U.A.,Bashir, K.M., Bragavatulal, P.L. (2013) Nanogold-Loaded Sharp-Edged Carbon Bullets as Plant-Gene Carriers. Advanced Functional Materials. Advanced Functional Materials, 20 (15); 38-45.

Wang, P., Lombi, E., Zhao E., Fang J., Kopittke Y., Peter, M. (2016). Nanotechnology: A New Opportunity In Plant Sciences. Trends In Plant Science, 21(8); 699-712. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/J.Tplants.2016.04.005>

Yoosaf, K., Ipe, B., Suresh, CH., Thomas, K.G. (2007). In situ synthesis of metal nanoparticles and selective naked-eye detection of lead ions from aqueous media. J Phys Chem C., 111; 12839-12847.

Zhang, B., Zheng, L.P., Yi L.W., Wang W.J. (2013) Stimulation of Artemisinin Production in *Artemisia annua* Hairy Roots by Ag-SiO₂ Core-shell Nanoparticles. Curr. Nanoscience, 9(3); 363–370. DOI:<https://doi.org/10.2174/1573413711309030012>

Zuverza-Mena, N., Armendariz, R., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, Y.JL. (2016). Effects of silver nanoparticles on *Radish sprouts*: Root growth reduction and modifications in the nutritional value. Frontiers In Plant Science, 7(90); 1-11. DOI:<http://dx.doi.org/10.3389/Fpls.2016.00090>

