



## NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN EL ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE ÁPICES DE GLADIOLO

### SILVER NANOPARTICLES IN THE *in vitro* ESTABLISHMENT OF GLADIOLUS APICES

J. Antonio Chávez-García<sup>1</sup>, Ma. Andrade-Rodríguez<sup>1\*</sup>, Jericó J. Bello-Bello<sup>2</sup>,  
Ma. Claudia Rueda-Barrientos<sup>1</sup>, Dagoberto Guillén-Sánchez<sup>3</sup> y Manuel de J. Sainz-Aispuro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cuernavaca, Morelos, México. <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. <sup>3</sup>Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc, Xalostoc, Morelos, México.

\*Autora de correspondencia (maria.andrade@uaem.mx)

#### RESUMEN

La micropropagación de plantas puede ser limitada por varios factores, como la contaminación *in vitro*. La desinfección en la etapa de establecimiento es uno de los pasos más importantes en la prevención de la contaminación bacteriana y fúngica. Las nanopartículas de plata (NPsAg) son un material que muestra alta capacidad en la eliminación de microorganismos. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de las NPsAg como auxiliar en la desinfección de ápices de gladiolo y en la desinfección del medio de cultivo. Las NPsAg se aplicaron como auxiliar en la desinfección de explantes, en cuatro concentraciones (25, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup>) y se combinaron con cuatro tiempos de inmersión (5, 10, 15 y 20 min). Por otro lado, las NPsAg se utilizaron en cinco concentraciones (0, 25, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup>), como parte del medio de cultivo para evitar el crecimiento de microorganismos. Con 50 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg se obtuvo el mayor porcentaje de asepsia (91.67 %) y la mejor longitud del brote (28.62 mm). El tiempo de inmersión de 5 a 20 min de los explantes en NPsAg no tuvo efecto en la asepsia de los mismos, pues el resultado fue similar en los cuatro tiempos de inmersión. El análisis de interacción de factores sugiere que 50 mg L<sup>-1</sup> durante 15 min fue el mejor tratamiento. La desinfección del medio de cultivo con 25, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg generó 100 % de asepsia, en tanto que el control, sin NPsAg, mostró 80 % de contaminación con microorganismos. El uso de 50 mg L<sup>-1</sup> generó una longitud del brote 35.5 % mayor, en comparación con el control sin NPsAg.

**Palabras clave:** *Gladiolus* sp., agente desinfectante, desinfección de explantes, nanopartículas de plata.

#### ABSTRACT

Plant micropropagation can be limited by various factors, such as *in vitro* contamination. Disinfection at the establishment stage is one of the most important steps in the prevention of bacterial and fungal contamination. The silver nanoparticles (AgNPs) are a new non-toxic material that shows high capacity in the elimination of microorganisms. The objectives of this research were to evaluate the effect of AgNPs as an auxiliary in the disinfection of gladiolus apices and in the disinfection of the culture medium. The AgNPs were applied as an aid in the disinfection of explants in four concentrations (25, 50, 100 and 200 mg L<sup>-1</sup>) and they were combined with four immersion times (5, 10, 15 and 20 min). In addition, the AgNPs were used in five concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 mg L<sup>-1</sup>), as part of the culture medium to prevent the growth of microorganisms. The amount of 50 mg L<sup>-1</sup> of AgNPs produced the highest percentage of asepsis (91.67 %) and the best shoot length (28.62 mm). The immersion time of 5 to 20 min of the explants

in AgNPs had no effect on the asepsis of explants, since the result was similar in the four times of immersion. Factor interaction analysis suggests that 50 mg L<sup>-1</sup> for 15 min was the best treatment. The disinfection of the culture medium with 25, 50, 100 and 200 mg L<sup>-1</sup> of AgNPs generated 100 % asepsis, while the control, without AgNPs, showed 80 % microorganisms contamination. The use of 50 mg L<sup>-1</sup> generated a 35.5 % longer sprout length, compared to the control without AgNPs.

**Index words:** *Gladiolus* sp., disinfectant agent, explants disinfection, silver nanoparticles.

#### INTRODUCCIÓN

Entre los diversos avances científicos, la nanotecnología (NT) se ha identificado como una tecnología potencial para reactivar la agricultura, industria alimentaria, purificación del agua, remediación ambiental, mejora de cultivos y la protección de las plantas (Pramanik *et al.*, 2020). Su aplicación en diferentes cultivos ha incrementado la germinación y crecimiento de plántulas, actividad fisiológica, la expresión de los genes y la actividad bioquímica de proteínas y enzimas en las plantas, indicando su potencial para mejorar de manera sustentable el rendimiento de cultivos agrícolas (Lira *et al.*, 2018).

La propagación *in vitro* de gladiolo es una alternativa a los métodos convencionales de propagación, pues aumenta la tasa de multiplicación y genera material libre de patógenos. Sin embargo, ésta se ve limitada por la contaminación causada por microorganismos (hongos, bacterias, entre otros), ya que estos, en el medio aséptico, provocan competencia por nutrientes, modificación del medio de cultivo, producción de compuestos tóxicos, reducción en la tasa de inducción de brotes y raíces o la destrucción del explante (Levitus *et al.*, 2010; Al-Ani, 2011; Memon *et al.*, 2012; Arab *et al.*, 2014; Bernard *et al.*, 2015).

La aplicación de nanopartículas (NPs) en el cultivo de

tejidos vegetales se ha usado con éxito en la eliminación de contaminantes microbianos de los explantes y ha mostrado efecto positivo en la inducción de callos, organogénesis, embriogénesis somática, variación somaclonal, transformación genética y producción de metabolitos secundarios. Su efectividad depende de las dimensiones, tamaño, distribución y tipo de partícula. La adición de NPs al medio de cultivo afecta la proliferación de callos, la multiplicación de brotes, la embriogénesis somática y el enraizamiento, al alterar la actividad de las enzimas antioxidantes, la expresión génica, la inhibición de la producción de etileno, metabolismo antioxidante y la producción de especies de oxígeno reactivo (Castro-González *et al.*, 2019).

Recientemente, se ha impulsado el uso de NPsAg como una alternativa a los procedimientos químicos comunes para el control de contaminantes *in vitro* durante la producción de brotes, con menor probabilidad de que los microorganismos generen resistencia, en comparación con los antibióticos, ya que la plata ataca a una amplia gama de objetivos en los microbios; además, no causa fitotoxicidad (Rai *et al.*, 2009; Rostami y Shahsavari, 2009; Taghizadeh y Solgi, 2014). Las NPsAg tienen gran aplicación en la biotecnología de plantas, debido a su potencial microbicida y como inductor del crecimiento de las plantas, afectando de manera positiva cuando se usa en la dosis correcta (Ku-Puch *et al.*, 2018; Castro-González *et al.*, 2019).

El mecanismo de la fuerte actividad antimicrobiana de las NPsAg está relacionado con el tamaño de la partícula y la superficie de contacto, con los cambios estructurales que provoca en la membrana bacteriana, con su interacción con los grupos fosforilados y azufrados de varios compuestos y con la interrupción en la producción de adenosín trifosfato y replicación del ADN (Pal *et al.*, 2007; Monge, 2009; Durán *et al.*, 2010). La actividad biocida de las NPsAg se ha probado en más de 600 microorganismos (Bernard *et al.*, 2015).

Entre los métodos físicos más comunes para la desinfección está la aplicación de calor húmedo mediante el uso de la autoclave. La desinfección química se realiza generalmente con agentes químicos, que pueden ser desinfectantes o antisépticos compatibles con los tejidos biológicos (Pérez-Uz y Vázquez, 2010). Existen algunos métodos y productos químicos disponibles para controlar estas contaminaciones; sin embargo, la eficiencia de su uso es todavía limitada o son tóxicos. También se usan antibióticos para controlar las contaminaciones por bacterias, aunque pueden afectar el desarrollo y la respuesta de los explantes induciendo resistencia en las bacterias (Rostami y Shahsavari, 2009; Al-Ani, 2011; Safavi, 2012).

Con el progreso de la nanotecnología y el desarrollo de nuevas nanopartículas metálicas de plata se abre la posibilidad de utilizar estas modernas alternativas en el control de patógenos. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano de las NPsAg en el establecimiento de explantes de gladiolo *in vitro*, así como evaluar el efecto de cinco concentraciones de NPsAg como agente desinfectante del medio de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Centro de Desarrollo Tecnológico "Tezoyuca" del FIRA (Fideicomiso Instituido en Relación a la Agricultura), en Tezoyuca, Morelos, México. La investigación constó de dos experimentos.

Se usaron cormos de gladiolo var. 'Ámsterdam' de un lote comercial para producción de flor de corte de un productor de la zona poniente del estado de Morelos. Se utilizaron macetas de 15.2 cm de diámetro en donde se colocó tepojal como sustrato, con granulometría de 5 mm; se plantaron los cormos y se aplicó riego diariamente por 25 d. Cuando brotaron las yemas y tuvieron de 1.5 a 2.0 cm de altura se lavaron los cormos y se aislaron los ápices cortando desde la base (con parte del tallo madre) y se obtuvieron explantes de 7 mm de diámetro de base y 1.5 cm de altura. Los explantes se sumergieron en una solución de agua desmineralizada con hipoclorito de sodio al 3 %, más 0.5 g L<sup>-1</sup> de detergente. Los explantes se mantuvieron en agitación constante por 5 min, en condiciones de asepsia. Los ápices fueron colocados por 18 min en una solución de agua destilada estéril con hipoclorito de sodio comercial al 0.6 %, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se usaron para evaluar el efecto de las NPsAg.

### Nanopartículas de plata como agente desinfectante de explantes de gladiolo *in vitro*

La adición de NPsAg se utilizó como auxiliar en el método de desinfección de ápices de gladiolo durante el establecimiento *in vitro*. El producto utilizado en esta investigación fue AgROVIT-CP, que son nanopartículas de plata esféricas de 35 ± 15 nm, funcionalizadas con polivinilpirrolidona (PVP, 10-30 kD). La solución madre original AgROVIT-CP al 20 % corresponde a una concentración de 1.2 % (peso) de plata metálica (COLPOS-Córdoba, 2014). Las NPsAg se prepararon con agua desmineralizada estéril.

Después de la desinfección con hipoclorito de sodio se formaron 16 grupos de ápices para evaluar el efecto de cuatro concentraciones de NPsAg (25, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup>), en combinación con cuatro tiempos de inmersión de los explantes (5, 10, 15, y 20 min) en la asepsia de los

explantos de gladiolo. Al finalizar cada tratamiento se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

El medio de cultivo usado fue Murashige y Skoog (1962), suplementado con vitaminas: tiamina, piridoxina, glicina y ácido nicotínico ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $120 \text{ mg L}^{-1}$  de inositol,  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BA, 3 % de sacarosa, 0.75 % de agar; el pH se ajustó a 5.7. Como recipiente de cultivo se usaron tubos de ensayo ( $150 \times 25 \text{ mm}$ , capacidad de 55 mL) y se dosificaron 20 mL de medio de cultivo en cada uno; el medio de cultivo se esterilizó a  $120 \text{ °C}$  durante 18 min.

Después de aplicados los tratamientos con NPsAg a los ápices, con ayuda de un microscopio estereoscópico, se eliminaron las hojas de cada explante hasta que se obtuvieron ápices de 4 mm aproximadamente y se estableció un ápice por tubo de cultivo. Los tubos con los explantes se colocaron en incubación a  $24 \pm 2 \text{ °C}$  de temperatura, 16 h de iluminación y 8 h de oscuridad; la irradiancia fue de  $32 \text{ Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos ( $4 \times 4$ ) y seis repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió en un tubo de ensayo con un explante.

Tres semanas después del establecimiento *in vitro* se evaluó la asepsia de los explantes y medio de cultivo. A las seis semanas se midió la longitud del brote (mm), número de brotes por explante y contenido de clorofila (unidades SPAD) (SPAD-502 Plus, Fledscout®).

#### **Nanopartículas de plata como agentes antimicrobianos en el medio de cultivo**

Se preparó medio de cultivo MS (1962) suplementado con vitaminas: tiamina, piridoxina, glicina, ácido nicotínico ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $120 \text{ mg L}^{-1}$  de inositol,  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BA, 3 % de sacarosa, 0.75 % de agar; el pH se ajustó a 5.7. El medio se colocó en matraces de 250 mL y se calentó hasta punto de ebullición, hasta que hirvió durante al menos 5 min. Las NPsAg se incorporaron al medio de cultivo en la concentración requerida para cada tratamiento (0, 25, 50, 100 y  $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) cuando este tuvo una temperatura aproximada de 75 a  $80 \text{ °C}$ . Éste se agitó manualmente para homogeneizar las NPsAg e inmediatamente después se sirvieron alícuotas de 20 mL en tubos de ensayo (previamente esterilizados por 18 min a  $120 \text{ °C}$ ); el proceso de dosificación del medio se realizó en la campana de flujo laminar. Una vez solidificado el medio de cultivo se estableció un explante por tubo. Los tubos fueron incubados en las condiciones descritas en el experimento anterior.

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar, con cinco tratamientos y 10 repeticiones. Tres semanas después se evaluó la asepsia de los explantes y medio de cultivo y a las seis semanas se midió la longitud del brote (mm), número de brotes por explante y contenido de clorofila (unidades SPAD) (SPAD-502 Plus, Fledscout®).

En los datos obtenidos en ambos experimentos se hicieron análisis de varianza y la prueba de comparación de medias LSD (DMS,  $P \leq 0.05$ ) mediante el paquete estadístico SAS (SAS, 2009).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Nanopartículas de plata como agente desinfectante de explantes de gladiolo *in vitro***

La mayor incidencia de microorganismos se presentó cuando los explantes se desinfectaron con  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de NPsAg; en tanto que el uso de 50 y  $100 \text{ mg L}^{-1}$  generó la mayor asepsia, misma que fue 20.74 % más alta que con  $25 \text{ mg L}^{-1}$ . Sin embargo, al usar la mayor cantidad de NPsAg la asepsia fue 8.33 % menor que con 50 y  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (Cuadro 1); esto indica que 50 y  $100 \text{ mg L}^{-1}$  son las mejores concentraciones de NPsAg para obtener la asepsia de explantes de gladiolo.

El número de brotes por explante, el diámetro de los brotes y el contenido de clorofila no presentaron diferencias por efecto de la concentración de NPsAg usada para la desinfección de los explantes.

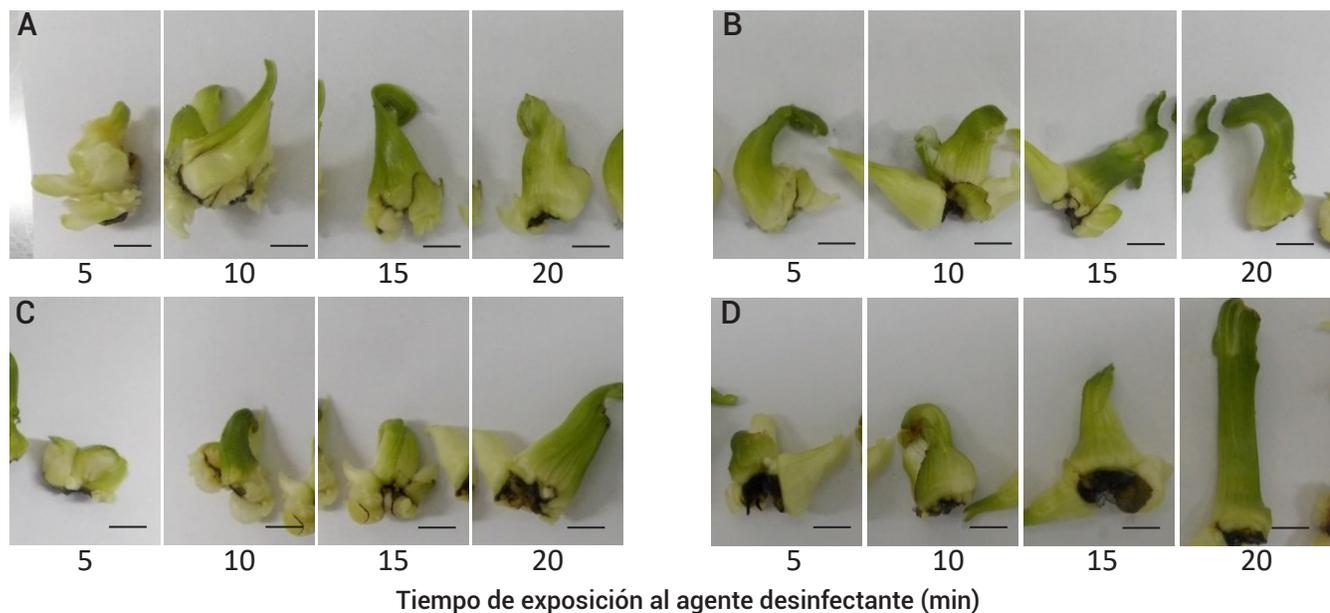
La longitud del brote fue mayor al desinfectar los explantes con  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de NPsAg; en contraste, la menor longitud de brotes se tuvo al usar  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ; el número de brotes por explante y contenido de clorofila no presentaron diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 1, Figura 1). La asepsia y longitud de brote permiten señalar que  $50 \text{ mg L}^{-1}$  fue la concentración de NPsAg más adecuada para la desinfección de los explantes de gladiolo, así como para el crecimiento inicial de los ápices.

Con respecto al tiempo de exposición a las NPsAg, se observó que no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos para la asepsia y contenido de clorofila de los explantes (Cuadro 2), lo que indica que cualquiera de los cuatro tiempos de inmersión de los explantes en NPsAg fue adecuado para una desinfección, aunque no se logró la asepsia total. Al respecto, Abdi *et al.* (2008), al realizar un experimento para evaluar el potencial de las nanopartículas de plata ( $25, 50$  y  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) en tres tiempos de inmersión 30, 60 y 180 min para eliminar

**Cuadro 1. Efecto de la concentración de NPsAg como agente desinfectante en el establecimiento *in vitro* de gladiolo.**

Concentración de NPsAg (mg L <sup>-1</sup> )	Asepsia (%)	Brotos por explante (Núm.)	Diámetro de brote (mm)	Longitud de brote (mm)	Contenido de clorofila (Unidades SPAD)
25	70.83 b	3.25	9.93	20.68 b	17.47
50	91.67 a	3.43	9.62	28.62 a	19.98
100	91.67 a	2.68	9.25	18.18 b	18.44
200	83.33 ab	3.00	11.12	23.56 ab	17.32
DMS (P ≤ 0.05)	14.77	0.76	2.01	5.73	4.78

En las columnas, medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSD, ≤ 0.05); DMS: Diferencia mínima significativa.



**Figura 1. Efecto de la concentración de NPsAg como agente desinfectante en el establecimiento *in vitro* de ápices de gladiolo, seis semanas después del establecimiento (barra = 1.0 cm). A: 25 mg L<sup>-1</sup>, B: 50 mg L<sup>-1</sup>, C: 100 mg L<sup>-1</sup>, D: 200 mg L<sup>-1</sup>.**

bacterias de explantes nodales de valeriana, observaron que 100 mg L<sup>-1</sup> por 180 min de inmersión generó 89 % de explantes asépticos. Ellos señalan que las NPsAg no afectaron el crecimiento de los explantes, a pesar de utilizar un tiempo de inmersión nueve veces mayor al usado en la presente investigación. Lo anterior indica que para la desinfección de explantes de gladiolo podría usarse mayor tiempo de exposición a las NPsAg. Por su parte, Pastelín-Solano *et al.* (2020) estudiaron los efectos de las NPsAg sobre la contaminación fúngica y bacteriana durante el establecimiento *in vitro* de la vainilla (*Vanilla planifolia*) en un medio semisólido, al evaluar 0, 25, 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg con 5, 10 y 20 min de exposición. Ellos reportan menor contaminación fúngica y bacteriana al usar 100 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg, independiente del tiempo de exposición del explante.

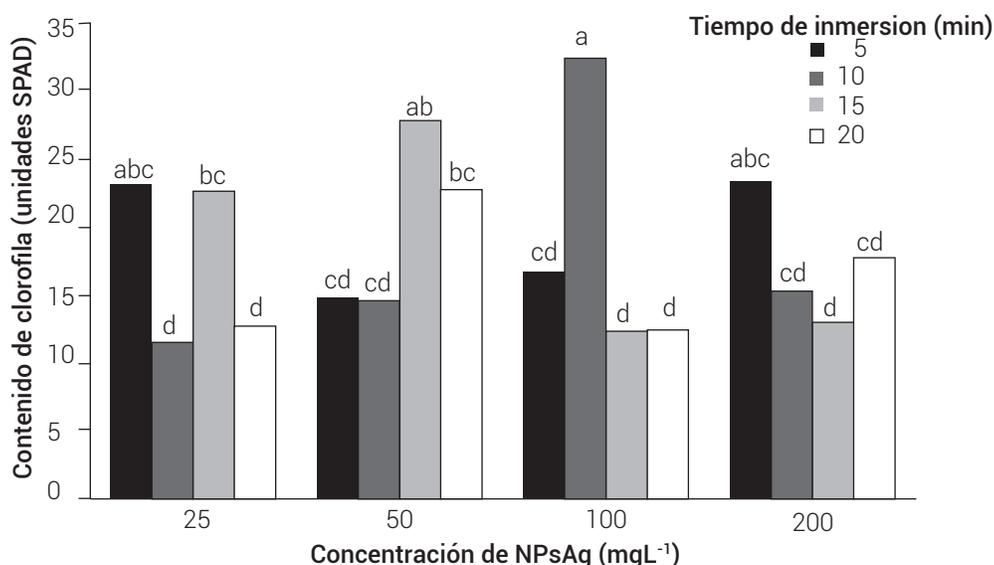
El número de brotes fue similar al desinfectar por 5 ó 10 min, pero al hacerlo por 15 min se obtuvo el mayor número de brotes; sin embargo, al aumentar a 20 min el tiempo de inmersión de los explantes el número de brotes fue menor que con los otros tres tiempos de desinfección. La longitud del brote varió de 19.25 a 26.56 mm. El mayor valor correspondió a los brotes cuyos explantes fueron desinfectados por inmersión de NPsAg durante 15 min, mientras que el menor valor se obtuvo al desinfectar por 10 min. Considerando el número de brotes por explante y longitud del brote, el mejor tiempo de inmersión en NPsAg fue 15 min (Cuadro 2, Figura 2).

La interacción de la concentración de NPsAg y el tiempo de exposición mostraron efecto altamente significativo (P ≤ 0.01) solo para el contenido de clorofila (Figura 2), indicando que la concentración y el tiempo de exposición con mejor

**Cuadro 2. Efecto del tiempo de exposición de NPsAg como agente desinfectante en el establecimiento *in vitro* de gladiolo.**

Tiempo de inmersión (min)	Asepsia (%)	Brotos por explante (Núm.)	Diámetro de brote (mm)	Longitud de brote (mm)	Contenido de clorofila (Unidades SPAD)
5	91.67	3.25 ab	9.56 ab	23.31 ab	19.47
10	79.17	3.25 ab	11.43 a	19.25 b	18.43
15	83.33	3.37 a	9.75 ab	26.56 a	18.93
20	83.33	2.50 b	9.18 b	21.93 ab	16.39
DMS ( $P \leq 0.05$ )	14.77	0.76	2.01	5.73	4.78

En las columnas, medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSD,  $\leq 0.05$ ); DMS: Diferencia mínima significativa.



**Figura 2. Efecto de la concentración de NPsAg en combinación con el tiempo de inmersión en el establecimiento *in vitro* de gladiolo (DMS = 9.57).**

resultado fue 100 mg L<sup>-1</sup> con 10 min (32.40 unidades SPAD). Castro-González *et al.* (2019) estudiaron el efecto de la aplicación de 0, 12.5, 25, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg sobre la regeneración *in vitro* de stevia (*Stevia rebaudiana* B.) y observaron que con 25 mg L<sup>-1</sup> aumentó el contenido de clorofila, en tanto que, con 12.5 mg L<sup>-1</sup> los valores fueron menores. También indican que el uso de 12.5, 25 y 50 mg promovieron la más alta producción de brotes y la longitud por explante, mientras que, el tratamiento control y 200 mg L<sup>-1</sup> mostraron la menor producción de brotes y longitud.

El uso de NPsAg es conveniente al no presentar intoxicaciones a las plantas cultivadas *in vitro* y eliminar agentes contaminantes. Mahna *et al.* (2013) indican que el uso de NPsAg, en la concentración y tiempo de exposición adecuada, pueden ser una herramienta eficaz para la eliminación de contaminantes de los tejidos de la planta. Fakhrfeshani *et al.* (2012) investigaron la

actividad antifúngica y antibacteriana de las NPsAg en la micropropagación de gerbera en cuatro concentraciones (25, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup>) y cuatro tiempos de exposición del explante (15, 30, 60 y 180 min) y reportaron que 200 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg por 15 min de inmersión controló exitosamente la contaminación bacteriana y fúngica, sin efectos negativos sobre la regeneración de plantas de gerbera. Bello-Bello *et al.* (2018) presentaron el primer estudio de los efectos citotóxicos y genotóxicos promovidos por las NPsAg en plántulas de *Vanilla planifolia* después de un tiempo de exposición de seis semanas e identificaron 25 y 50 mg L<sup>-1</sup> (1.5 y 3 mg L<sup>-1</sup> de plata metálica) como concentraciones seguras para el crecimiento de *Vanilla planifolia* en condiciones *in vitro*. Por lo anterior, se puede decir que la concentración de NPsAg y el tiempo de inmersión variarán en función de la especie, así como del tipo de explante desinfectado con este agente, para obtener una desinfección adecuada sin ocasionar toxicidad.

**Nanopartículas de plata como agentes antimicrobianos en el medio de cultivo**

La concentración de NPsAg en el medio de cultivo tuvo efecto significativo ( $P \leq 0.05$ ) en la longitud de los brotes y contenido de clorofila (Cuadro 3). El efecto de las cuatro concentraciones de NPsAg (25, 50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup>) mostró 100% de asepsia en el medio de cultivo; sin embargo, con la ausencia de NPsAg la contaminación microbiana fue del 80% (Figura 3). Safavi (2012), al evaluar cinco concentraciones de NPsAg (5, 25, 50, 75 y 100 mg L<sup>-1</sup>) como parte del medio MS, reportó buenos resultados con 100 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg para eliminar contaminantes bacterianos en el medio de cultivo, obteniendo buen desarrollo de explantes. Por su parte, Ouda (2014) demostró que las NPsAg son una gran promesa como agente antimicrobiano para el control efectivo de fitopatógenos como la *Alternaria alaternata* y *Botrytis cinérea*. Sarmast et al. (2011) demostraron que en *Araucaria excelsa* R. Br. var. *glauca* (Norfolk Island-pino) (*syn.*: *A. heterophylla*) al adicionar las NPsAg al medio de cultivo eliminaron con éxito la contaminación, a diferencia de los descontaminantes convencionales.

De manera similar a lo investigado en este trabajo, Shokri et al. (2014), en un experimento con rosas, adicionaron NPsAg al medio de cultivo (0, 50, 100 y 150 mg L<sup>-1</sup>) y en otro experimento los explantes se sumergieron por 20 min en diferentes soluciones de NPsAg (0, 100, 200 y 400 mg L<sup>-1</sup>). Ellos observaron que la concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> adicionada directamente al medio puede reducir la contaminación bacteriana y la tasa de exudación fenólica y que la desinfección con 200 mg L<sup>-1</sup> por 20 min de inmersión fue el mejor tratamiento para controlar la incidencia de bacterias. También, Ku-Puch et al. (2018) evaluaron el efecto microbicida de las NPsAg en la micropropagación de tomate criollo (*Solanum lycopersicum*) con 50 mg L<sup>-1</sup> en cultivo en medio semisólido, lo que se tradujo en una disminución significativa de la contaminación.

El uso de nanopartículas de plata como parte del medio de cultivo, para evitar el crecimiento de agentes microbianos, contribuirá a reducir el consumo de la energía eléctrica que normalmente se requiere para esterilizar los medios de cultivo a usar en la micropropagación de plantas y en particular de producción de microcormos de gladiolo.

La longitud del brote fue mayor conforme se incrementó la cantidad de NPsAg en el medio de cultivo hasta 50 mg L<sup>-1</sup>, pero cuando la concentración fue mayor los brotes fueron más pequeños. Con 50 mg L<sup>-1</sup> se obtuvieron brotes 35.5% más altos en comparación con el control sin NPsAg (Cuadro 3); sin embargo, el contenido de clorofila de los brotes fue mayor con 25 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg, 45% más clorofila que cuando no se usaron NPsAg. En general, considerando 4 de 5 variables, la mejor concentración de NPsAg para desinfectar el medio de cultivo y para el crecimiento de los explantes fue 50 mg L<sup>-1</sup>.

Al igual que en esta investigación, Aghdaei et al. (2012) evaluaron el efecto de las NPsAg en la micropropagación de *Tecomella undulata* (Roxb) e indicaron que la adición de NPsAg al medio MS aumentó el número de brotes por explante, el porcentaje de explantes que producen brotes y también la supervivencia de la planta, debido a su acción sobre el bloqueo de etileno. Sarmast y Salehi (2016) sugieren que la principal ventaja del uso de NPsAg en la horticultura se centra en las propiedades antimicrobianas y nutritivas, así como en la mejora del crecimiento de las plantas en la concentración permisible.

**CONCLUSIONES**

El uso de nanopartículas de plata como auxiliar en la desinfección de explantes resultó ser una herramienta eficaz en el control de la contaminación microbiana. Los resultados de esta investigación indican que con 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> de NPsAg y 15 ó 20 min de exposición se obtienen resultados adecuados para la asepsia y crecimiento de los ápices de gladiolo.

**Cuadro 3. Efecto de la concentración de NPsAg en el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de gladiolo.**

Concentración de NPsAg (mg L <sup>-1</sup> )	Asepsia (%)	Brotos por explante (Núm.)	Diámetro de brote (mm)	Longitud de brote (mm)	Contenido de clorofila (Unidades SPAD)
0	20	3.2	15.00	40.00 ab	16.0 b
25	100	3.6	12.80	50.00 ab	29.2 a
50	100	3.8	16.20	62.00 a	18.1 b
100	100	2.8	13.20	44.00 ab	11.0 b
200	100	2.4	13.80	26.00 b	15.2 b
DMS ( $P \leq 0.05$ )		2.01	4.61	30.93	9.31

En las columnas, medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSD,  $\leq 0.05$ ); DMS: Diferencia mínima significativa.



Figura 3. Efecto de la concentración de NPsAg en el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de gladiolo.

### BIBLIOGRAFÍA

- Abdi G., H. Salehi and M. Kush-Khui (2008) Nano Silver: A novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) Tissue Culture. *Acta Physiologia Plantarum* 30:709-714. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0169-z>
- Aghdaei M., H. Salehi and M. K. Sarmast (2012) Effect of silver nanoparticles on *Tecomella undulata* (Roxb) Seem. micropropagation. *Advances in Horticultural Science* 26:21-24. <https://doi.org/10.13128/ahs-12748>
- Al-Ani N. K. (2011) Using silver nano-particles to increase efficiency of sterile solution for *in vitro* techniques. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics* 4:48-51.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2014.10.002>
- Bello-Bello J., J. Spinoso-Castillo, S. Arano-Avalos, E. Martínez-Estrada, M. Arellano-García, A. Pestryakov and N. Bogdanchikova (2018) Cytotoxic, genotoxic, and polymorphism effects on *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews after long-term exposure to Argovit® silver nanoparticles. *Nanomaterials* 8:754.
- Bernard F., N. N. Moghadam and F. Mirzajani (2015) The effect of colloidal silver nanoparticles on the level of lignification and hyperhydricity syndrome in *Thymus daenensis* vitro shoots: a possible involvement of bonded polyamines. *Plant Tissue Culture In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 51:546-553. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9700-2>
- Castro-González C. G., L. Sánchez-Segura, F. C. Gómez-Merino and J. J. Bello-Bello (2019) Exposure of stevia (*Stevia rebaudiana* B.) to silver nanoparticles *in vitro*: transport and accumulation. *Scientific Reports* 9:1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46828-y>
- COLPOS-Córdoba (2014) Ficha técnica AgROVIT-CP. Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. México. 1 p.
- Durán N., P. D. Marcato, R. De Conti, O. L. Alves, F. T. M. Costa and M. Brocchi (2010) Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of Brazilian Chemical Society* 21:949-959. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000600002>
- Fakhrfeshani M., A. Bagheri and A. Sharifi (2012) Disinfecting effects of nano silver fluids in gerbera (*Gerbera jamesonii*) capitulum tissue culture. *Journal of Biological and Environmental Sciences* 6:121-127.
- Ku-Puch G. A., J. H. Caamal-Velázquez, J. E. Ramírez-Benítez y N. L. Rodríguez-Ávila (2018) Efecto de las nanopartículas de plata en la micropropagación de tomate criollo (*Solanum lycopersicum*). *Revista del Centro de Graduados e Investigación* 33:73-78.
- Levitus G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp and L. Mroginski (2010) *Biología y Mejoramiento Vegetal II*. Ediciones INTA. Argentina. 648 p.
- Lira S R. H., B. Méndez A., A. De los Santos V. e I. Vera R. (2018) Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta Universitaria* 28: 9-24. <http://doi.org/10.15174/au.2018.1575>
- Mahna N., S. Z. Vahed and S. Khani (2013) Plant *in vitro* culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of *ex vitro* explants. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology* 4:161. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000161>
- Memon N., A. Yasmin, V. M. Pahoja, Z. Hussain and I. Ahmad (2012) *In vitro* regeneration of gladiolus propagules. *Journal of Agricultural Technology* 8:2331-2351. <http://www.ijat-aatsea.com>
- Monge M. (2009) Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericida. *Investigación Química* 105:33-41.
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Ouda S. M. (2014) Antifungal activity of silver and copper nanoparticles on two plant pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. *Research Journal of Microbiology* 9:34-42. <https://doi.org/10.3923/jm.2014.34.42>
- Pal S., Y. K. Tak and J. M. Song (2007) Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 6:1712-1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>
- Pastelín-Solano M. C., M. A. Ramírez-Mosqueda, N. Bogdanchikova, C. G. Castro-González y J. J. Bello-Bello (2020) Las nanopartículas de plata afectan la micropropagación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *Agrociencia* 54:1-13.
- Pérez-Uz S. y T. Vázquez (2010) Metodología de esterilización en el laboratorio microbiológico. *Reduca (biología), Serie Microbiología* 3:1-14.
- Pramanik P., P. Krishnan, A. Maity, N. Mridha, A. Mukherjee and V. Rai (2020) Application of Nanotechnology in Agriculture. In: Dasgupta N., Ranjan S., Lichtfouse E. (eds) *Environmental Nanotechnology*, volume 4. Environmental Chemistry for a Sustainable World, volume 32. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-26668-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-26668-4_9)
- Rai M., A. Yadav and A. Gade (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 27:76-83. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>
- Rostami A. A. and A. Shahsavari (2009) Nano-silver particles eliminate the *in vitro* contaminations of olive "Mission" explants. *Asian Journal of Plant Sciences* 8:505-509. <https://doi.org/10.3923/ajps.2009.505.509>
- Safavi K. (2012) Evaluation of using nanomaterial in tissue culture media and biological activity. 2nd International Conference on Ecological, Environmental and Biological Sciences (EEBS'2012) oct. 13-14, 2012 Bali (Indonesia). pp 5-8.
- Sarmast M. K., H. Salehi and M. Khosh-Khui (2011) Nano silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of *Araucaria excelsa* R. BR. Var. *Glauca* explants. *Acta Biologica Hungarica* 62:477-484. <https://doi.org/10.1556/ABiol.62.2011.4.12>
- Sarmast M. K. and H. Salehi (2016) Silver nanoparticles: an influential element in plant nanobiotechnology. *Molecular Biotechnology* 58:441-449. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9943-0>
- Shokri S., A. R. Babaei, M. Ahmadian, S. Hessami and M. M. Arab (2014) The effects of different concentrations of nano-silver on elimination of bacterial contaminations and phenolic exudation of Rose (*Rosa hybrida* L.) *in vitro* culture. *Acta Horticulturae* 1083: 391-396. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.49>

**SAS, Statistical Analysis Software (2009)** Statistical analysis system  
Institute Inc. Cary, NC, USA. Proprietary Software Version 9.00  
(TS M0).

**Taghizadeh M. and M. Solgi (2014)** The application of essential oils and silver

nanoparticles for sterilization of bermuda grass explants in *in vitro*  
culture. *International Journal of Horticultural Science and Technology*  
2:131-140. <https://doi.org/10.22059/IJHST.2014.52784>