

Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología

Informe Escrito Final

Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas de plata sobre el crecimiento *in vitro* de plantas de banano Cavendish (*Musa acuminata*) del cultivar Grand Naine

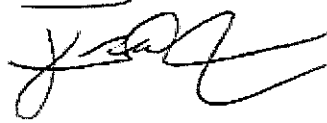
Proyecto de tesis de grado presentado como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Biotecnología

Victor Montoya Sequeda
(A00119934)

Campus

Omar Dengo Heredia, septiembre 2022

Este trabajo de graduación fue aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.



Dr. Frank Solano Campos

Presidente del Tribunal



MSc. Marianelly Esquivel Alfaro

Director de la Escuela de Ciencias Biológicas



MSc. Emmanuel Araya Valverde



Dr. Oscar Rojas Carrillo



Lic. Jorge Araya Matthey

Resumen

Recientemente las nanopartículas se han implementado en muchas áreas de la investigación incluyendo la biotecnología vegetal. Por este motivo se ha estudiado el efecto de las nanopartículas metálicas como las de oro (AuNPs), cobre (CuNPs), zinc (Zn NPs) entre otras, en diversas especies vegetales. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de las nanopartículas de plata (AgNPs) sobre el crecimiento de plantas de banano Cavendish. Las nanopartículas fueron sintetizadas en presencia de quitosano, presentando un diámetro hidrodinámico de 390 nm, un aspecto esférico, una carga superficial de +55.35 mV y absorbancia a los 425 nm. Se observó que el método de síntesis empleado permite obtener nanopartículas de plata estables en el tiempo en concentraciones de 2085 ppm determinado por medio de ICP-MS. Se determinó que las AgNPs tienen un efecto fitotóxico sobre las plantas de banano, ya que estas exhibían menor desarrollo en términos de biomasa fresca y seca de raíces, hojas y pseudotallos en comparación con las de control. Se observó una reducción de biomasa a nivel de las raíces y los pseudotallos en las plantas tratadas con 5, 10 y 15 ppm de AgNPs. Contrariamente, la biomasa en las hojas de las plantas tratadas con 5 ppm y 10 ppm de AgNPs aumentó levemente (2% y 3% respectivamente), mientras que las tratadas con 15 ppm redujeron su biomasa en un 14% respecto del control. El estudio de traslocación de diferentes concentraciones de AgNPs (0-10 mg/L) demostró que las nanopartículas entran en la planta a través de las raíces y se acumulan en una mayor concentración a este nivel. Sin embargo, luego de 8 semanas las partículas migran a las porciones superiores de la planta a través del tejido vascular. Consecuentemente, la presencia de AgNPs se relaciona con la apariencia de las raíces quebradizas, además de las hojas y pseudotallos cloróticos.

Agradecimiento

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a la Corporación Bananera Nacional (CORBANA) quienes facilitaron el desarrollo de esta investigación al brindar los recursos vegetales necesarios para el montaje de este ensayo. Gracias por hacer posible este estudio.

Del mismo modo, agradezco al Centro Nacional de Innovaciones en Biotecnología (CeNIBiot) por brindar las instalaciones y el equipo de laboratorio que hizo posible el montaje de los diversos ensayos durante el transcurso de la investigación.

Agradezco a la Universidad Nacional por la formación académica que me brindó a lo largo de estos años, la cual permitió concluir el desarrollo de este proyecto y culminar mi grado académico; además del apoyo económico por medio de la beca FOCAES, la cual fue de gran importancia en la adquisición de los materiales necesarios para la elaboración de esta investigación.

Gracias por su guía y orientación durante el desarrollo de este proyecto a mi tutor MSc. Emmanuel Araya Valverde, sin quien el diseño experimental de los ensayos en plantas hubiera sido imposible, su aporte fue invaluable. Mi agradecimiento al Dr. Oscar Rojas y al Licenciado Jorge Araya Matthey por su tutela en la preparación de las soluciones de nanopartículas empleadas durante el proyecto y su dirección en la búsqueda de información al respecto.

Un agradecimiento especial a mis colegas en la unidad de Biotecnología de Organismos Fototróficos en el CeNIBiot, sin ellos no habría sido posible el montaje de los ensayos sobre las plantas y en especial la toma de datos de los sujetos de estudio. Quiero mostrar mi aprecio hacia Cristófer Orozco Ortíz por sus incontables consejos durante todo el desarrollo de este proyecto y desde mis comienzos en la institución, dicha asesoría ha sido monumental no solo para esta investigación, sino que en mi formación como profesional.

Se agradece a Edgar Cañizares y Centent Alvarado de Nano Innovation SRL. Costa Rica por el acceso al microscopio electrónico de barrido.

Por último, quiero agradecer al Dr. Meyer Guevara Mora por su orientación en el desarrollo del análisis estadístico.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi compañero Crístofer, por su inmenso apoyo tanto como guía durante el desarrollo de este proyecto y en especial por nunca permitir que me diera por vencido, incluso si amenazaba con ello todos los días durante esta encrucijada.

A mis padres, por todo el amor y cariño que me mostraron incluso si discutíamos y peleábamos por mis deseos de renunciar. Gracias por jamás perder su fe en mí y más importante aún, por no permitirme perder la fe en mí mismo.

Índice

Resumen	II
Agradecimiento	III
Dedicatoria	IV
Índice	V
Índice de cuadros	VIII
Índice de figuras	IX
Abreviaturas o acrónimos	X
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Justificación	6
1.3. Planteamiento del problema	8
1.4. Objetivos	8
1.4.1. Objetivo General	8
1.4.2. Objetivos específicos	8
2. Marco teórico	9
2.1. Biotecnología agrícola	9
2.1.1. Generalidades	9
2.1.2. Técnicas existentes	9
2.2. Cultivo <i>in vitro</i>	10
2.2.1. Generalidades	10

2.2.2. Sistemas y tipos de medio de cultivo existentes.....	10
2.3. <i>Musa acuminata</i>	11
2.3.1. Generalidades de la especie	11
2.3.2. Ubicación geográfica y variedades	11
2.3.3. Importancia.....	12
2.3.4. Impacto económico en el mundo	12
2.4. Nanopartículas	13
2.4.1. Generalidades y síntesis	13
2.4.2. Aplicaciones de las nanopartículas en agricultura en condición <i>ex vitro</i> ..	14
2.5. Ensayos empleando nanopartículas sobre plantas <i>in vitro</i>	15
3. Marco Metodológico	17
3.1. Origen y establecimiento de material vegetal	17
3.2. Preparación y caracterización de las nanopartículas de plata	17
3.3. Preparación del medio de cultivo e inoculación con diluciones de AgNPs.....	18
3.4. Selección y siembra de los explantes de banano	19
3.5. Evaluación de parámetros biológicos y traslocación de las AgNPs.....	19
3.6. Análisis estadístico	20
4. Resultados	21
4.1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata (AgNPs)	21
4.2. Comparación de los métodos de inclusión de las nanopartículas.....	25
4.3. Efectos de las AgNPs sobre parámetros biológicos de las plántulas de banano	26
4.4 Absorción y traslocación de las AgNPs en el tejido vegetal.....	30
5. Discusión	35
5.1. Método de síntesis y caracterización de las AgNPs.....	35

5.2. Método de inclusión de las nanopartículas de plata	36
5.3. Efectos de la exposición de plántulas de banano a AgNPs	37
5.4. Translocación de las nanopartículas a las distintas porciones de las plantas ..	39
6. Conclusiones y recomendaciones	42
7. Referencias bibliográficas	44
8. Anexos	58

Índice de cuadros

Cuadro 1: Parámetros biológicos de plántulas de banano luego de 30 días de exposición ...	26
Cuadro 2: Parámetros biológicos de plántulas de banano luego de 60 días de exposición ...	27
Cuadro 3: Efecto de las AgNPs sobre la biomasa fresca luego de 30 días de exposición.....	28
Cuadro 4: Efecto de las AgNPs sobre la biomasa fresca luego de 60 días de exposición.....	28
Cuadro 5: Efecto de las AgNPs sobre la biomasa seca luego de 30 días de exposición	29
Cuadro 6: Efecto de las AgNPs sobre la biomasa seca luego de 60 días de exposición	29

Índice de figuras

Figura 1: Nanopartículas de plata sintetizadas por medio de síntesis química asistida por autoclave luego de 1 hora de reacción (derecha) y solución de quitosano sin nitrato de plata (izquierda).....	21
Figura 2: Representación esquemática de la interacción de AgNO_3 y Ag^0 con quitosano en disolución ácida.....	22
Figura 3: Espectro de absorción de nanopartículas de plata determinado de una muestra de 1 mL de nanopartículas de plata utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta.....	23
Figura 4: Nanopartículas de plata esféricas sintetizadas por medio de métodos químicos y asistido por autoclave observadas al microscopio TEM.....	24
Figura 5: Nanopartículas de plata luego de ser agregadas al medio de cultivo empleando los dos métodos de esterilización: Autoclave y filtración. a) Medio MS al 100% m/v con nanopartículas incorporadas antes de autoclavar, b) Medio MS 50% m/v con Agar y nanopartículas filtradas incorporadas luego de autoclavar, c) Medio MS 100% m/v con Phytigel con nanopartículas incorporadas luego de autoclavar.	25
Figura 6: Raíces de plántulas de banano expuestas a AgNPs en medio de cultivo MS 50% incubadas a 25°C y en un fotoperíodo de 18h luz.....	30
Figura 7: Plántulas de banano luego de 60 días de exposición a AgNPs en medio de cultivo MS 50% incubadas a 25°C y en un fotoperíodo de 18h luz.....	31
Figura 8: Hojas de plantas de banano luego de dos meses de exposición a AgNPs en medio MS 50% incubadas a 25°C y en un fotoperíodo de 18h luz.....	32
Figura 9: AgNPs acumuladas en las distintas partes de la planta luego de 30 días y 60 días de exposición en medio de cultivo MS 50% y a 25°C y un fotoperíodo de 18h luz.....	33
Figura 10: A) Micrografía de SEM para la muestra de Raíz sin adición de AgNPs (blanco (sin). B) EDS para esta muestra. C) Micrografía SEM de la muestra de Raíz con la adición de 10 mg/ml de AgNPs. D) EDS para esta muestra.	34
Figura 11: A, C, E y G) Micrografías de SEM para muestras de tallo y hojas sin la adición de AgNPs (blancos) y con la adición de 10 mg/ml de AgNPs, respectivamente. B, D, F, H) EDS para las muestras de tallo y hojas sin la adición de AgNPs (blancos) y con AgNPs.....	59

Abreviaturas o acrónimos

AgNO ₃	Nitrato de plata
AgNPs	Nanopartículas de plata
ARN	Ácido ribonucleico
CORBANA	Corporación Bananera Nacional
CuNPs	Nanopartículas de cobre
DLS	Dispersión de luz dinámica
FAO	Organización de Alimentos y Agricultura
FeNPs	Nanopartículas de hierro
ICP-MS	Espectroscopía de masas inducida por plasma
MS	Medio Murashige-Skoog (1962)
NPs	Nanopartículas
PVP	Polivinil pirrolidona
ROS	Especies de oxígeno reactivo
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
UV-Vis	Espectro de luz Ultravioleta-Visible
ZnONPs	Nanopartículas de óxido de zinc

1. Introducción

La aplicación de la biotecnología en los sistemas vegetales ha sido reportada en un número de contribuciones científicas que demuestran el desarrollo de nuevos e innovadores productos desde el fortalecimiento de suelos, hasta el mejoramiento de frutos y cultivos, por medio de formulaciones de fertilizantes, pesticidas estimuladores y reguladores de crecimiento de las plantas. Dentro de la diversidad de cultivos, uno de las principales es el cultivo de banano, el cual representa una actividad agroindustrial de gran interés económico para el país. Desde este contexto, la búsqueda de alternativas innovadoras como los sistemas de liberación controlada de agentes activos para la mejora y protección del cultivo ante patógenos es uno de los principales desafíos. La introducción de nano materiales de naturaleza metálica a base de zinc, cobre o plata también han sido reportados en el sector agrícola. En este estudio se buscará comprender el efecto de nanopartículas sobre plantas de banano variedad Cavendish (*Musa acuminata*), así como; el proceso de absorción, translocación y acumulación dentro de la planta y sus efectos sobre la morfología de las mismas.

1.1. Antecedentes

Las nanopartículas (NPs) son estructuras que logran alcanzar tamaños de hasta 100 nanómetros. Estas pueden estar fabricadas de materia inorgánica como metales y óxidos metálicos o materia orgánica como el carbono (Vance *et al.*, 2015). Según el método de síntesis llegan a tener distintas formas como esféricas, decahédricas, piramidales y hasta tubulares. La nanotecnología es un área de investigación relativamente nueva, que cobro fuerza entre los años 2009 y 2010, se han descubierto aplicaciones en campos como la medicina, farmacología, ingeniería de materiales y electrónica (Wolfram *et al.*, 2015).

Las nanopartículas, en especial las metálicas y de carbono se han convertido en un tema de especial interés para la agricultura empleadas como agentes para fitomejoramiento, acondicionamiento de suelos y como alternativas en el control de plagas (Capaldi Arruda *et al.*, 2015). Se ha estudiado la capacidad antibiótica de las nanopartículas en medio de cultivo (Safavi,

2014). Los investigadores probaron estos efectos aplicando nanopartículas de titanio en cultivo de papa en medio MS previo al proceso de esterilización. Se probaron concentraciones de 1 y 2 en porcentaje masa/masa de NPs. Concluyeron que la presencia de las nanopartículas reduce la cantidad de microorganismos en el medio. Entre otros estudios que se han llevado a cabo se ha demostrado la capacidad como agente antibacterial y antifúngico de las nanopartículas de plata (AgNPs) en portainjertos de híbridos de almendras y duraznos (Garnem) (Arab *et al.*, 2014). Las plantas estériles se expusieron a 5 concentraciones de plata diferentes (0, 50, 100, 150 y 200 ppm). Se observó una tendencia a la reducción en la presencia de bacterias conforme se aumentaba la concentración de plata, en el caso del control hubo un 57% de contaminación bacteriana y en el tratamiento de 200 ppm hubo 0.55% de contaminación. Por su parte la contaminación fúngica también se redujo en las plantas tratadas con plata respecto del control de 41% a 31% en la concentración de 200 ppm.

La misma tendencia se pudo observar al comparar tiempos de exposición con la concentración de nanopartículas. Adicionalmente, se ha visto los efectos de las AgNPs sobre la morfología de plántulas de *Eruca sativa* (Singh *et al.*, 2020). Se observó un efecto similar en el largo de las raíces de plantas tratadas con AgNPs en concentración de 10 y 20 mg/L, una germinación de más de 90%, mientras que en concentraciones de 100 mg/L se vio una marcada disminución en el largo y el número de raíces respecto del tratamiento control.

En un estudio se logró determinar la capacidad fitotóxica de las AgNPs esféricas, la exposición resultó en efectos adversos en el desarrollo vegetal de plantas de tabaco a concentraciones de nanopartículas entre 100 y 500 μM (Cvjetko *et al.*, 2018) con tamaños 61.2 ± 33.9 nm suspendidas en agua MiliQ. Se pudo demostrar efectos destructivos en las células vegetales, los cuales podrían haber provocado el crecimiento reducido de las plantas. Esto es atribuido a la producción de especies reactivas de oxígeno.

En ensayos realizados sobre plantas de pepino (*Cucumis sativus*) se comparó la capacidad fitotóxica de nanopartículas sintetizadas por medios químicos y por medios biológicos (Zhang *et al.*, 2021). Los autores concluyen que las nanopartículas químicas presentan una mayor fitotoxicidad que las de origen biológico, mientras que estas últimas promovieron la fotosíntesis en la planta.

También se ha visto que las nanopartículas de plata reducen la capacidad fotosintética de las plantas al interrumpir la cadena de transporte de electrones (Falco *et al.*, 2019). Se utilizó AgNPs en concentración de 100 mg/L en los experimentos y se observó reducción en la capacidad fotosintética de plantas de *Vicia faba* conforme se aumentaban los tamaños de las partículas.

Por otro lado, existen estudios en los que se ha logrado determinar efectos positivos de las AgNPs en aspectos como la elongación, enraizamiento y la brotación de varios cultivos (Yin *et al.*, 2012). Yin y sus colaboradores analizaron los efectos de la plata en la germinación de once especies diferentes (*L. multiflorum*, *Panicum virgatum*, *Carex lurida*, *C. scoparia*, *C. vulpinoidea*, *C. crinita*, *Eupatorium fistulosum*, *Phytolacca americana*, *Scirpus cyperinus*, *Lobelia cardinalis*, *Juncus effusus*) así como de sus efectos en la brotación. Se llegó a la conclusión de que en concentraciones de 40 mg/L puede ser beneficiosa para aumentar el largo de las hojas, pero en concentraciones superiores a esta inhibe la germinación. Se probaron nanopartículas esféricas recubiertas con PVP, ácido gálico y en suspensión líquida.

Empleando *Arabidopsis* sp. se analizó el efecto de la morfología de las nanopartículas sobre el crecimiento de las plantas (Syu *et al.*, 2014). Se evaluaron tres morfologías diferentes: Triangular, decahédricas y esférica. Las NPs decahédricas mostraron los mejores efectos sobre el desarrollo radicular y el crecimiento de las plantas. Se mostró un incremento en el tamaño de casi el doble (de 2 cm en el control a casi 4 cm).

Otro estudio realizado sobre plantas de vainilla (*Vanilla planifolia*) probó los efectos de las nanopartículas de plata sobre el crecimiento y la brotación, también la contaminación de los cultivos (Spinoso-Castillo *et al.*, 2017). Según los resultados observados, la exposición a las concentraciones más bajas (25 y 50 ppm) hubo un incremento en la cantidad de brotes en estos tratamientos respecto del control, de 2.15 a 4.71 en el tratamiento de 50 ppm respectivamente. Investigadores han estudiado los efectos de las nanopartículas de plata sobre plantas de cebolla (*Allium cepa*) y rábano (*Raphanus sativus*) (Pittol *et al.*, 2017). Expusieron las plantas en suspensiones de NPs en concentraciones de 0, 0.01, 1, 100 y 1000 mg/L. En las plantas de cebolla se notó una reducción significativa en el crecimiento de las raíces conforme se aumentaba la concentración de plata. No así, en el caso del rábano, en el cual según lo observado no se determinaron diferencias en el crecimiento radicular. Investigaciones más recientes han llegado a conclusiones similares, lo que se varía es la concentración de AgNPs.

Se han evidenciado efectos positivos al aplicar nanopartículas en bajas concentraciones a cultivos de plantas *in vitro*. En ciertos casos, agregar pequeñas cantidades de nanopartículas de plata o de carbono aumenta la biomasa de los cultivos (Jasim *et al.*, 2017). Se probó el efecto de AgNPs sintetizadas a partir de nitrato de plata y extractos bacterianos sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de *Trigonella foenum* cultivado por cinco días en agar en frascos cónicos con 200 μ L de AgNPs esféricas con tamaño entre 8 y 21nm, luego otros cinco días en 100 g de tierra estéril con la misma concentración de NPs, a partir de los ensayos ellos concluyeron que hubo un incremento tanto en el número de hojas como en el largo de los tallos en los explantes tratados con las nanopartículas (1.36 ± 0.23 y 6.03 ± 0.45) respecto del control. Se ha observado que las plantas tienden a absorber nanopartículas en los órganos vegetales de dos maneras: por difusión o por rompimiento de las mismas (Servin *et al.*, 2015).

Bagherzadeh y sus colaboradores han logrado establecer los efectos de las AgNPs sobre la fisiología de plantas de papa cultivadas *in vitro* (Bagherzadeh Homae & Ehsanpour, 2015). En estos cultivos la plata demostró tener efectos negativos sobre el largo de los tallos. Por otro lado, el largo de las raíces y el área foliar aumento en todas las plantas que fueron tratadas con AgNPs esféricas de 20 nm y nitrato de plata en concentraciones de 10 mg/L. Esto puede deberse a que las AgNPs funcionan como un inhibidor de etileno.

Vidyalakshmi y sus colaboradores evaluaron los efectos morfogenéticos de las AgNPs y el nitrato de plata sobre vitroplantas de banano. En este trabajo reportaron el uso de nanopartículas esféricas de tamaños entre 8 y 31 nm sintetizadas empleando extractos de bacterias como matriz. En cuanto a los parámetros de crecimiento como peso fresco y peso seco no se observó diferencias significativas entre las plantas tratadas y el control, sin embargo, las plantas tratadas con plata tenían una abundancia de pequeños brotes a lo largo del tallo. Esto podría indicar posibles efectos positivos en brotación (Vidyalakshmi *et al.*, 2017).

En cuanto a las nanopartículas de plata aplicadas a cultivo *in vitro* de banano, se ha estudiado los efectos que estas tienen sobre la proliferación de cultivos de callos. Se determinó que concentraciones de nanopartículas de plata entre 1 ppm y 5 ppm promueven el desarrollo de brotes y alargamiento del tallo, aumentando la biomasa, sin embargo, observaron lo opuesto en concentraciones de 7 ppm, en este punto el desarrollo foliar se reducía debido a posibles efectos fitotóxicos (Giap *et al.*, 2018).

En un estudio realizado en Egipto se determinó los efectos de distintas concentraciones de AgNPs e iones de plata sobre bananos *Musa acuminata* (El-Mahdy *et al.*, 2019). Se concluyó que en concentraciones entre 1 a 5 ppm ocasionan efectos positivos sobre el crecimiento de plántulas de banano. Adicionalmente, se determinó que las AgNPs son menos tóxicas que los iones de plata (Štefanić *et al.*, 2021). Según este ensayo la reducción del crecimiento en las plantas tratadas con los iones de plata se debe a una disminución del índice mitótico.

Investigadores han intentado describir lo que sucede con las nanopartículas al entrar en contacto con el tejido y han intentado establecer el destino final de estas en las plantas (Singh *et al.*, 2015). Se ha logrado determinar que las nanopartículas pueden provenir del aire, agua y la tierra y estas entran en el organismo vegetal por medio de los tejidos vasculares (Kurczyńska *et al.*, 2021). Los investigadores han determinado que a nivel celular la primera barrera a superarse es la pared celular, la cual es superada por medio de transporte con los apoplastos, a través de los poros, los cuales limitan la entrada de las NPs. El estudio mencionado referencia diversas investigaciones donde se ha analizado la traslocación de nanopartículas metálicas en organismos vegetales.

Una investigación reciente ha logrado establecer 2 focos de entrada de las NPs: Hojas y raíz (Lv *et al.*, 2019). En cuanto a las hojas, ellos concluyen que penetran por medio de las estomas y el tejido vascular en las mismas. Esto se ve limitado por los fitopatógenos presentes en las hojas cuyos exudados promueven la disolución de las nanopartículas según los autores. En el caso de las raíces se llega a una conclusión similar, sin embargo, establecen que las raíces cuentan con más barreras a superar, por lo que es más fácil penetrar a través de las hojas. Otros estudios concluyen que depende mucho del medio de exposición, tamaño de la partícula y la naturaleza del cultivo, que como tal afectan la traslocación de estas (Ahmadov *et al.*, 2020).

Un estudio desarrollado sobre plantas de rábano con nanopartículas de óxido de cerio (CeO₂ NPs) demostró que las partículas sufren una transformación al entrar en la rizosfera antes de ser asimiladas (Zhang *et al.*, 2016). Dentro de las células lo que ocurre según los estudios es que las nanopartículas son acumuladas en los plastidios y las mitocondrias (Hubbard *et al.*, 2020).

1.2. Justificación

El banano (*Musa sp.*) es una de las frutas más importantes a nivel mundial. Esto se debe a que es una importante fuente de biocompuestos como vitaminas, minerales y fibra natural (Medina *et al.*, 2015). Adicionalmente, para países de la región tropical representa una importante fuente de ingresos como producto de exportación. Por ejemplo, en Costa Rica el banano representa un 7% del PIB del país y se estima que aproximadamente un 1% del territorio nacional está destinado a la producción bananera, siendo la principal zona productora la región Caribe. Dicha región depende en gran manera de este cultivo para subsistir (CORBANA, 2020). Considerando la importancia y valor económico que posee el banano para el país es importante buscar estrategias que garanticen la seguridad tanto de frutos como del cultivo. Entre las estrategias que se pueden utilizar están las nanopartículas. Ellas pueden ser sintetizadas usando varios métodos y muchos agentes encapsulantes (Wiesner *et al.*, 2015).

El quitosano es uno de los polímeros más utilizados en la síntesis de nanoencapsulados (Mohammed *et al.*, 2017). Según los autores el quitosano presenta ventajas al ser un biopolímero, por ejemplo, mejora la solubilidad de los fármacos y otras sustancias contenidas en ellos. Existen estudios realizados en el área de agricultura (Kumari *et al.*, 2019) en los cuales se habla de sistemas de distribución inteligentes para sustancias como reguladores de crecimiento y fertilizantes. Los autores concluyen que los recubrimientos de quitosano debido a su naturaleza como polímero biodegradable mejora la absorción de los nutrientes y una distribución controlada de sustancias. Según Kumari y sus colaboradores, este conjunto de características mejora la respuesta de las plantas a los agroquímicos.

Una herramienta que se ha empleado, principalmente para la propagación de material de alta calidad genotípica, es el cultivo de tejidos *in vitro* (Sandoval *et al.*, 2018). Debido al control que se tiene sobre las condiciones de cultivo, es posible producir plantas libres de patógenos. La estabilidad de las condiciones *in vitro* es una herramienta valiosa para realizar diversos ensayos sobre las plantas y el tejido (Kishor *et al.*, 2018). Al implementar la técnica de cultivo *in vitro* como instrumento para facilitar la evaluación, se pueden modificar las condiciones de tal manera que no haya interferencia de elementos externos sobre el desarrollo del material vegetal y así se puede concluir que los efectos observados son producto de las condiciones fijadas por el investigador tanto ambientales como en el sustrato de crecimiento.

Existen muchos estudios como los que se menciona en los antecedentes en los cuales se ha discutido efectos positivos de bajas concentraciones de plata sobre los tejidos vegetales. Sin embargo, también concluyen que es importante realizar más estudios para determinar el movimiento de las partículas de plata en diversos organismos vegetales. Además, si bien los efectos de la plata sobre el crecimiento de banano han sido estudiados y se ha encontrado efectos tanto benéficos como perjudiciales (El-Mahdy *et al.*, 2019), estos estudios no hacen mención sobre el movimiento de las partículas dentro de las plantas de banano y entre los estudios mencionados los resultados de caracterización de las nanopartículas solo listan tamaño y forma, el potencial Z queda excluido de los resultados reportados.

1.3. Planteamiento del problema

¿Cuál es el efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (AgNPs) sobre el crecimiento de vitroplantas de banano Cavendish (*Musa acuminata*) del cultivar Grand Naine y hacia donde se translocan dentro de la planta?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Determinar el efecto de las nanopartículas de plata sobre el crecimiento de banano Cavendish (*Musa acuminata*) del cultivar Grand Naine mediante ensayos *in vitro* con miras a su aplicación agronómica.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la estabilidad de las nanopartículas incluidas en medios para el cultivo *in vitro*, utilizando dos estrategias de esterilización diferentes (autoclave y filtración).
2. Analizar el efecto de la inclusión de nanopartículas de plata en el cultivo *in vitro* de plántulas de banano mediante la medición de diferentes secciones de la planta y registro de masa fresca y seca de las mismas.
3. Evaluar la absorción y traslocación de nanopartículas de plata en el tejido vegetal mediante microscopía electrónica y espectrometría de masas inducido por plasma (ICP-MS).

2. Marco teórico

2.1. Biotecnología agrícola

2.1.1. Generalidades

La biotecnología agrícola hace referencia a un conjunto de técnicas y herramientas científicas cuyo propósito es el mejoramiento de los cultivos (Dahabieh *et al.*, 2018). Las técnicas de mejoramiento de cultivos se han utilizado desde hace miles de años, sin embargo, la implementación de biotecnología se dio a finales del siglo XX y para principios del siglo XXI millones de productores a nivel mundial ya usaban estas herramientas, más de un 85% de ellos están en países en vías de desarrollo (Landrum *et al.*, 2018). Entre las mejoras que se busca implementar en los alimentos destaca la modificación en aspectos como el color, sabor y el contenido nutricional. Para lograr estos objetivos la agrobiotecnología dispone de muchas técnicas.

2.1.2. Técnicas existentes

Con el fin de lograr el mejoramiento de la calidad de los cultivos tanto productores como científicos han desarrollado distintas técnicas de modificación (Anand & Jones, 2018). Entre estas herramientas destacan el cruzamiento, mutagénesis, fusión de protoplastos y poliploidía. Las más comunes, sin embargo, son las técnicas de transgénesis, edición genómica y ARN interferente (Dalakouras *et al.*, 2020). A través de estas herramientas es posible dotar a las plantas de interés de características favorables que mejoran su calidad y la resistencia a factores externos como las condiciones climáticas, del suelo y al ataque de patógenos. En el caso de los bananos (*Musa sp.*) por ejemplo, una plaga importante es el hongo *Fusarium oxysporum*. Científicos han concentrado sus esfuerzos en desarrollar cultivos que sean resistentes al ataque del fitopatógeno, así como la implementación de otros métodos de control (Tripathi *et al.*, 2020). Se ha descubierto que la herramienta CRISPR-Cas-9 es muy efectiva para lograr ‘apagar’ el gen por medio de deleciones en el genoma vegetal y con transformación mediada por *Agrobacterium* se introduce el conjunto de genes Cas-9 y las guías en las células. Esto permite eliminación de genes que promueven el desarrollo de los efectos generados por factores bióticos y abióticos.

2.2. Cultivo *in vitro*

2.2.1. Generalidades

El cultivo *in vitro* de especies vegetales consiste en un conjunto de técnicas que permiten el establecimiento de material vegetal capaz de crecer en condiciones controladas de laboratorio (Rani & Kumar, 2017). En esencia el objetivo general de las técnicas es la regeneración de organismos completos a partir de fragmentos pequeños denominados explantes. Los explantes pueden ser de cualquier tipo de tejido: desde una semilla, hasta segmentos de hojas, siempre que sean capaces de replicarse. Si bien el cultivo *in vitro* tiene muchas ventajas, existen desventajas al aplicar estas técnicas: costos de laboratorio y equipos alto y se requiere de destrezas y conocimiento extenso de técnicas asépticas de trabajo (Espinosa-Leal *et al.*, 2018).

El desarrollo de estas técnicas se basa en dos conceptos fundamentales: plasticidad y totipotencia (Singh, 2018). La plasticidad se refiere a la capacidad que tienen las células de un organismo de alterarse con el fin de adaptarse a las condiciones circundantes y la totipotencia es la capacidad de una célula de regenerar un organismo completo (Warghat *et al.*, 2018).

Existen muchas técnicas dentro del cultivo *in vitro* que son aplicadas según el tipo de especie vegetal que se desea estudiar. En particular para el caso de banano, se emplea una técnica denominada cultivo de meristemos (Sandoval *et al.*, 2018). Los meristemos son regiones de la planta que son ricas en células indiferenciadas. Estas se encuentran en las regiones de mayor crecimiento: los ápices y las regiones axilares (Frank *et al.*, 2015). La técnica consiste en tomar la planta y aislar esta sección para luego cultivar en medio nutritivo bajo condiciones de asepsia.

2.2.2. Sistemas y tipos de medio de cultivo existentes

Como se mencionó anteriormente, el fin del cultivo *in vitro* es obtener material vegetal de alta calidad. Según el propósito final y volumen de producción deseado se trabaja en distintos tipos de medio y sistemas (Isah *et al.*, 2018). En cuanto a los tipos de medio, varían entre especies, pero a grandes rasgos se pueden trabajar de dos maneras: semisólidos o líquidos. Por su parte, los medios semisólidos se distinguen porque adicional a los nutrientes se agrega un agente gelificante, el cual endurece el medio (Vives *et al.*, 2017). Las plantas cultivadas empleando esta estrategia se colocan en distintos recipientes como frascos y tinas sobre el medio que como ventaja ofrece cierto grado de soporte a los explantes, además proporciona los nutrientes de manera más paulatina lo cual favorece un desarrollo más pausado que puede ser lo necesario para observar ciertos efectos.

Los cultivos en medio líquido por su parte no llevan en su preparación el gelificante, además pueden trabajarse en sistemas especiales como biorreactores de inmersión temporal (Ruta *et al.*, 2020). La mayor ventaja de los sistemas de inmersión temporal y medio líquido radica en dos aspectos fundamentales: el acceso a nutrientes y la reducción de la oxidación (Shukla *et al.*, 2020).

2.3. *Musa acuminata*

2.3.1. Generalidades de la especie

El banano es una planta de la familia de las Musáceas. Es una planta de tipo herbácea que presenta una flor (Kashyap *et al.*, 2018). Se clasifica entre las plantas herbáceas de mayor tamaño ya que algunas variedades pueden alcanzar los 3m. Sus tallos no son leñosos, sino que se forman de capas de hojas. Se han reportado alrededor de 70 especies dentro del género *Musa* (Vincent & Anushma, 2018).

2.3.2. Ubicación geográfica y variedades

El banano es nativo del este asiático y Australia. En la actualidad se han distribuido ampliamente en las regiones tropicales (Kaplin *et al.*, 2017). Se ha reportado que el banano es cultivado en 135 países del mundo, entre los que destacan: Mozambique, Uganda, Kenia, entre otros en el este de África, India, Filipinas, Ecuador, Brasil y los países centroamericanos (Deuter *et al.*, 2012).

Se ha descubierto que existen cerca de 500 variedades de banano en el mundo, cada una con sus propias aplicaciones, es decir, según la región en la que se cultive, el sabor y tamaño del fruto, así como de la composición química de la planta cada variedad se emplea de manera diferente. Entre las 500 variedades destacan unas cuantas debido a que han sido utilizadas como producto de exportación, tal es el caso de los bananos Cavendish (Kumar Rana *et al.*, 2018), también se destacan otras variedades que son implementadas como alimento y de uso comercial a nivel local: Saba Bluggoe, Plantain y Goldfinger, entre otros. Estas son empleadas para cocina y consumo local en La Republica de la India, el este de África y América principalmente.

Dentro del grupo Cavendish destacan los cultivares Grand Nain, Petite Nain, Lacatan y Williams (Adedayo *et al.*, 2016). Todas ellas pertenecen al grupo cultivar AAA, es decir, son plantas triploides. Cada individuo cuenta con 33 cromosomas y producen frutos partenocárpicos

(sin semillas). De estos, el más comercializado a nivel mundial es el cultivar Grand Nain (Sj *et al.*, 2018).

2.3.3. Importancia

Se ha logrado establecer la composición química del banano, tanto del fruto como de la planta (Mathew & Negi, 2017). El banano es de gran importancia para el mundo como fuente de alimento debido a los nutrientes que aporta, tales como vitaminas, proteínas y es una excelente fuente de fibra natural y carbohidratos (Eshak, 2016). Los desechos de banano como las cáscaras y los rastrojos de las plantas también son una excelente fuente de nutrientes y han sido utilizados como suplemento alimenticio en la producción animal (Li *et al.*, 2016). Los seres humanos consumen el banano de muchas formas: crudo, en puré, jugos y batidos y en ciertas preparaciones cocidos.

Además de ser utilizado como alimento, el banano tiene muchas aplicaciones en la industria de fibras y textiles. Debido a su alto contenido de celulosa y lignocelulosa se ha empleado en la fabricación de telas como complemento para las tradicionales (Balakrishnan *et al.*, 2019). Además, en ciertos países se ha reducido el consumo de papel mediante la implementación de fibras de banano en la elaboración de este.

2.3.4. Impacto económico en el mundo

El banano a nivel mundial es de gran valor económico, en especial para las regiones tropicales, donde es fuente de ingresos dado a que se exporta a Estados Unidos y Europa. En algunos países de África, entre los que destaca Costa de Marfil, así como en la India es uno de los principales productos de exportación (Bouwmeester *et al.*, 2016). Para el 2017 Costa Rica exportó cerca de 1,000 millones de dólares en banano fuera del país (World to Exports, 2017). La India contribuye con el 0.3% de exportaciones mundiales. En estas regiones el banano se ha convertido más que un producto de exportación puesto que se vende mayormente a nivel local como alimento de subsistencia. Otro gran exportador de banano en la región de Asia es Filipinas, a nivel mundial ocupa el tercer puesto como exportador (FAO, 2020a).

En el continente americano destacan dos países como los principales exportadores, Ecuador y Costa Rica. Por un lado, Ecuador para el 2017 habría contribuido con el 30% de las exportaciones a nivel mundial (FAO, 2020b). Sólo en Costa Rica, se exportaron cerca de 128,000,000 cajas de banano en el año 2020, lo cual equivale a aproximadamente 2,300,000

toneladas métricas de fruta (CORBANA, 2020). Según estos datos, el banano representa un 7% del PIB del país y se estima que aproximadamente un 1% del territorio nacional está destinado a la producción bananera, siendo las principales zonas productora la región Caribe. Dicha región depende en gran manera de este cultivo para subsistir.

El banano exportado de América, Asia y África tiene dos destinos: Europa y los Estados Unidos. Según datos proporcionados por la FAO, la mayoría de las exportaciones van dirigidas a la Unión Europea, que recibe cerca de un 50% del total de exportaciones mundiales. Por su parte, EUA recibe cerca del 40% restante de las exportaciones.

2.4. Nanopartículas

2.4.1. Generalidades y síntesis

Las nanopartículas (NPs) son partículas que tienen un tamaño en escala desde 1-100 nm (Siddiqui *et al.*, 2015). La naturaleza de las NPs es muy diversa dado que los materiales de los que provienen son igual de diversos, algunos de estos materiales que pueden formar nanopartículas son: quitosano, metales, óxidos metálicos y lípidos (Sirelkhatim *et al.*, 2015).

Las NPs presentan formas muy diversas según los procedimientos y material empleado en su síntesis. Entre las formas más conocidas destacan: nanocables, cristales, esferas, agujas, entre otros (Whittaker & Mak, 2015). Los nanocables son construidos a partir de nanotubos cubiertos con titanio y otros metales, los nanocristales son sintetizados a partir de sales metálicas, que son empleadas como elemento aniónico. Las nanopartículas de plata con forma esférica son las más comunes y regularmente se encuentran recubiertas por moléculas simples (citrato de sodio) o macromoléculas (polímeros neutros o polielectrolitos) que proveen estabilidad contra la agregación (Gumustas *et al.*, 2017).

Existen diversos métodos para la síntesis de nanopartículas, se clasifican según el material y los instrumentos implementados en: métodos físicos, métodos químicos y métodos biológicos (Dhand *et al.*, 2016). Entre los métodos físicos destacan: la reducción de las sales precursoras por medio de radiación electromagnética (UV-Vis) y por medio de sonicación. Entre los métodos químicos destaca la reducción de la sal precursora (AgNO_3) mediante la adición de compuestos como borohidruro de sodio (NaBH_4) empleando medios de reacción blandos como: sol-gel (Salavati-Niasari *et al.*, 2016), micro emulsión (Pemartin-Biernath *et al.*, 2016), entre otros. Los

métodos biológicos incluyen la reducción de AgNO_3 asistido por microorganismos, hongos y extractos de plantas.

La síntesis biológica de NPs (también llamada síntesis verde de nanopartículas) hace uso de las propiedades redox de la maquinaria enzimática de los microorganismos y los hongos, así como de los extractos vegetales (Al-Rajhi *et al.*, 2017). Este método es ampliamente utilizado para sintetizar NPs metálicas y de óxidos metálicos. Al-Rajhi y sus colaboradores han logrado la creación de nanopartículas metálicas empleando extractos biológicos provenientes tanto de microorganismos y hongos como de plantas. En el caso de matrices de plantas, Dhand y sus colegas (2016) al igual que Noruzi (2015) han logrado sintetizar AgNPs implementando extractos de banano para la síntesis de AgNPs y partículas de cadmio (Dhand *et al.*, 2016). Las investigaciones mencionadas reportan la actividad antibiótica de AgNPs con porcentaje de inhibición promedio de 64% respecto de los cultivos en placas de control.

2.4.2. Aplicaciones de las nanopartículas en agricultura en condición *ex vitro*

El uso de las nanopartículas en el ámbito agrícola se ha investigado debido a las ventajas que presentan como potenciadores de crecimiento y, además, como agentes protectores contra el ataque de plagas (Mehrazar *et al.*, 2015). En cuanto al potencial como promotor de crecimiento, existen diversos estudios que argumentan que las nanopartículas de plata en bajas concentraciones mejoran el crecimiento de los cultivos (Kale *et al.*, 2021).

Recientemente, Dhir (2021) ha reportado el uso de AgNPs sobre plantas de maíz (*Zea mays*) en condición *ex vitro*, empleando nanopartículas de origen biológico sintetizadas a partir de extractos de hojas de *Tagetes erecta* y AgNO_3 en concentración de 3mM. Según lo encontrado, de las plantas tratadas con AgNPs mostraron un 87.5% de germinación respecto de las plantas control, de las cuales germinó únicamente el 50%. Se ha estudiado también la capacidad de remediación de las nanopartículas metálicas. El autor argumenta que las nanopartículas tienen diversas maneras de lograr la remediación de pesticidas tanto en suelos como en agua. En el caso de las partículas de hierro, las cuales se encuentran entre las más comúnmente utilizadas para este propósito según el autor, presentan un mecanismo de dechlorinación, este es aprovechado para la remoción de pesticidas como los organoclorados (Dhir, 2021).

Duhan y sus colaboradores vieron que las AgNPs mineralizan los pesticidas como el clorpirifós, logrando así la remediación de suelos en agricultura de precisión. Los autores argumentan que las nanopartículas son herramientas que permiten la distribución controlada de sustancias como las mencionadas y además permiten el control de enfermedades, lo cual permite mejor toma de decisiones en el cuidado de cultivos (Duhan *et al.*, 2017).

Al-khattaf (2021) sintetizó nanopartículas de plata empleando matrices fúngicas de *Aspergillus niger*. Según lo descubierto por los autores, las nanopartículas de plata superan en efectividad al agente nistatina, comúnmente usado en el control de patógenos fúngicos como *P. digitatum*, *A. flavus* y *F. oxysporum* y reportaron una concentración mínima inhibitoria de 6.75-9.62 µg/mL respecto de la nistatina (8.1-10.4 µg/mL). Además, argumentan que se alcanzó mayores porcentajes de inhibición en comparación con la nistatina. Se alcanzó inhibición de 91%, 93% y 97% en cada patógeno respectivamente (Al-khattaf, 2021).

2.5. Ensayos empleando nanopartículas sobre plantas *in vitro*

Los diferentes efectos que tiene la presencia o ausencia de las nanopartículas en un medio de cultivo vegetal pueden ser evaluados utilizando las técnicas de cultivo *in vitro* como herramienta para estandarizar las condiciones de crecimiento (Zainul *et al.*, 2017). Mediante estas técnicas es posible implementar un método de inclusión de nanopartículas al medio y evaluar sus efectos sobre el desarrollo vegetal ajustando diversos factores como el pH, temperatura y otros. El desarrollo de un protocolo permite ajustar las condiciones y los métodos que permitan aplicarlo sobre otros organismos.

Se ha estudiado los efectos fitotóxicos de las nanopartículas de plata y de sales como el nitrato de plata a nivel de las células vegetales. Lo encontrado en distintos ensayos revela que la posible fitotoxicidad radica en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Anna *et al.*, 2018). Mediante las técnicas *in vitro* se puede evaluar los efectos de las NPs sobre el crecimiento vegetal, la capacidad antioxidante y como control de plagas (Taha *et al.*, 2016).

Raja y sus colegas (2019) analizaron la germinación de semillas de *V. mungo* asistida por la aplicación de NPs. Trabajando con ambas semillas secas y semillas húmedas sumergidas en soluciones de ZnONPs de concentraciones de 400-1300 mg/kg y solución de CuNPs en las mismas

concentraciones, en ambos casos las NPs eran esférica. En cuanto a las ZnONPs se descubrió que la concentración de 900 mg/kg generaba los mayores porcentajes de germinación (mejoró en un 25% respecto del control) y se observó un incremento en el largo de tallos y raíces en 18 y 16% respecto del control (Raja *et al.*, 2019).

Se ha investigado los efectos de nanopartículas de zinc sobre la brotación de callos de banano. Se trabajó con NPs esféricas de óxido de zinc (ZnONPs), se usaron concentraciones entre 0.5 y 3.0 mg/L de nanopartículas. Los callos mostraron efectos positivos en la brotación en la concentración de 1.5 mg/L de ZnONPs, el número de brotes aumentó casi el doble respecto de los callos control (Choudhary *et al.*, 2018)

Domokos-Szabolcsy y sus colaboradores (2012) ha evaluado los efectos de nanopartículas de selenio sintetizadas a partir de selenito de sodio y extractos bacterianos sobre la brotación de callos de *Nicotiana tabacum*. Se cultivó tabaco en medio MS suplementado con ácido naftalenacético (ANA) en concentración de 0.0537 μ M, zeatina en concentración de 9.12 μ M y sacarosa al 2.0% m/v, las nanopartículas fueron incorporadas al medio al momento de preparación de este. Ellos observaron un incremento en la biomasa conforme se aumentaba la concentración de selenio en el medio. Los mejores resultados se observaron con 53 mM de selenio, donde el crecimiento de callos fue de 3.05 ± 0.3 respecto del control. En concentraciones mayores se observó que el desarrollo de callos se inhibía, así como el transporte de este en los callos (Domokos-Szabolcsy *et al.*, 2012).

Ghafariyan y su equipo estudiaron los efectos de nanopartículas de hierro esféricas de 9 nm sobre el contenido de clorofila en las plantas. La soya se cultivó en medio hidropónico suplementado con FeNPs. Ellas demostraron ser fitotóxicas, puesto que se observó una reducción en el desarrollo de tallos, brotes y un aumento en el contenido de clorofila de las plantas de soya. Se trabajó con concentraciones de 0-2000 mg/L. Se observaron mejoras ligeras en cuanto a germinación (aumento de 2 a 2.5 de índice de germinación). Por otro lado, la clorofila presente en la región subapical aumentó respecto del control (Ghafariyan *et al.*, 2013).

Las condiciones estériles de trabajo, así como el control sobre los parámetros de cultivo, hacen de los ensayos *in vitro* una herramienta valiosa para el análisis de los efectos de NPs. Posteriormente estos ensayos pueden ser adaptados para ser aplicados al campo.

3. Marco Metodológico

3.1. Origen y establecimiento de material vegetal

Para realizar el ensayo se obtuvo un total de 200 plantas de banano Cavendish Grand Naine de la organización CORBANA. Inicialmente, las plantas se encontraban en frascos con medio Murashige-Skoog (MS). Las plantas se colocaron en el cuarto de crecimiento a 25 °C con fotoperiodo de 18 h de luz, según las condiciones del cuarto disponible en el laboratorio, durante una semana como tiempo de cuarentena para observar la posibilidad de contaminación antes de ser sembradas en medio MS con las nanopartículas de plata para el ensayo.

3.2. Preparación y caracterización de las nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata (AgNPs) se prepararon utilizando el método de síntesis química descrito por Jamaludin y sus colaboradores (Jamaludin & Faizal, 2017). Se inició con la preparación de 90 mL de una solución de quitosano al 0.5% m/v en ácido acético 0.5% v/v. Se preparó 10 mL de una solución de nitrato de plata (AgNO_3) a la concentración de 0.1M. Seguidamente, los 90 mL de solución de quitosano se filtraron a través de poros de 0.22 μm y se agregó sobre los 10 mL de solución de AgNO_3 . La solución fue agitada y se dejó reaccionar a 121°C y 18 psi en autoclave Tuttnauer de Fisher Scientific durante 1 hora en frascos con cinta indicadora para comprobar el funcionamiento del equipo.

Al finalizar la reacción las nanopartículas se llevaron a cámara de flujo laminar donde se filtraron con ayuda de filtros de 0.22 μm . Las partículas se almacenaron en tubos de polipropileno con taparrosca de 50 mL y cubiertos con papel aluminio debidamente rotulados en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Las nanopartículas se caracterizaron por medio de dispersión de luz dinámica (DLS) en el Laboratorio de Tecnología y Ciencia de Polímeros de la Universidad Nacional. Por medio de esta técnica se determinó el tamaño de las partículas y su distribución. Se utilizó un Zetasizer (Malvern Instruments, Nano-ZS90) con un ángulo de 90° equipado con un láser He-Ne a una temperatura controlada de 25 °C en cubetas de poliestireno. El índice de refracción utilizado fue de 0,06, correspondiente a dispersiones coloidales de plata. Cada determinación se realizó cinco veces con

un mínimo de diez corridas, cada una con una duración de 10 s empleando agua destilada como blanco y 1 mL de muestra en cada cubeta.

Adicionalmente, las nanopartículas se caracterizaron por medio de espectroscopía ultravioleta empleando cubetas de poliestireno y con 1 mL de muestra en cada cubeta y empleando agua destilada como blanco. La obtención de imágenes de la morfología de las partículas sintetizadas se llevó a cabo con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7100 para las muestras de AgNPs recubiertos con quitosano. Se colocaron 200 μ L en el porta-muestra del instrumento y de la dispersión y se aplicó a un voltaje de 100 kV. Fueron medidas posteriormente usando el programa ImageJ y su concentración fue evaluada por espectrometría de masas inducida por plasma (ICP-MS) en los laboratorios del CICA empleando la metodología descrita por Baird y sus colegas (Baird *et al.*, 2018).

3.3. Preparación del medio de cultivo e inoculación con diluciones de AgNPs

El medio utilizado fue el Murashige-Skoog al 50% de sales empleando sacarosa de grado comercial con pureza de 99.5%, según el azúcar disponible en el laboratorio como fuente de carbono y agar de lote número 109K0040 de Sigma-Aldrich como agente gelificante. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 previo a la esterilización. El medio de cultivo se dispensó en 25 frascos con un volumen de 25 mL cada uno más el volumen fijado de NPs para cada tratamiento. Para esterilizar el medio de cultivo se llevó a la autoclave a 121°C durante una hora.

Para inocular las concentraciones con las que se trabajó primero se obtuvo la concentración de AgNPs en la solución madre a partir de la cual se agregó 48 μ L para 5 ppm, 96 μ L para 10 ppm y 144 μ L para 15 ppm, el tratamiento de control consistió únicamente en el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. Se inocularon nanopartículas de 3 maneras: primero se agregó 1 mL partículas directamente a tubos de vidrio de 5 mL con 1 mL de medio MS al 100% m/v y otro tubo con MS al 50% m/v y luego se colocaron en la autoclave para esterilizar tanto el medio como las nanopartículas. La segunda manera consistió en filtrar los volúmenes de las nanopartículas en los frascos con medio MS al 50% m/v solidificado con Phytigel en cámara de flujo laminar y, por último, la tercera manera de inclusión fue la inoculación de los volúmenes de NPs en medio MS al 50% m/v solidificado con agar, dispensado en cámara de flujo laminar. Los frascos se rotularon con la concentración de plata correspondiente y se sometieron a cuarentena en el laboratorio a temperatura ambiente (25°C) durante una semana con el fin de comprobar la esterilidad.

En términos de la estabilidad, esta se evaluó por observación directa de las nanopartículas en suspensión, si el medio de cultivo se tornaba de color levemente naranja se consideraba que las nanopartículas eran estables y estaban bien suspendidas. Por otro lado, si se tornaban de colores más oscuros o se formaban manchas de color naranja o aglomerados turbios esto era indicativo de partículas agregadas, por ende, no se incorporaron bien y no se suspendieron. Por problemas de oxidación y precipitación de las NPs en medio MS con 100% m/v de sales, en los ensayos posteriores se utilizó únicamente medio MS al 50% m/v de sales.

3.4. Selección y siembra de los explantes de banano

Luego de tener las plantas en inspección visual se seleccionaron plantas de tamaño similar para sembrar en cada tratamiento. Se seleccionaron 25 plantas para cada tratamiento, cada planta se extrajo de su medio de cultivo original y se eliminó las hojas y raíces más viejas (basales). Las plantas se sembraron en los frascos para cada tratamiento, una planta por frasco y se les asignó un código numérico, adicionalmente se rotuló el número de hojas y raíces iniciales. Las plantas sembradas se llevaron al cuarto de crecimiento en las condiciones de 25 °C y 18 h luz, según las condiciones del cuarto de cultivo del laboratorio donde crecieron durante 60 días.

3.5. Evaluación de parámetros biológicos y traslocación de las AgNPs

Con el fin de evaluar el movimiento de las nanopartículas en las plantas de banano se evaluaron las plantas en dos lotes: El primero a los 30 días y el otro a los 60 días.

Luego de 30 días en incubación se sustrajo el primer lote de plantas del cuarto de crecimiento para registrar los datos de longitud, número de hojas, raíces y la longitud de las mismas, además se realizó observación de los cambios en la coloración de hojas, tallos y raíces junto con la apariencia de la venación y la robustez de los pseudotallos. Seguidamente se registró la masa de material fresco, para ello se tomó las hojas nuevas, los pseudotallos y las raíces y se separaron y colocaron en sobres de papel aluminio debidamente rotulado y se pesaron. A continuación, se llevaron a una estufa a 60 °C durante 72 horas y luego se registró la masa de material seco.

Posteriormente, a las muestras se les determinó el contenido de plata por medio de la técnica de espectrometría de masas inducida por plasma (ICP-MS) (Baird *et al.*, 2018) también en

los laboratorios del CICA, a quienes se les pago por realizar los análisis. El segundo lote de plantas se extrajo luego de 60 días de exposición y se repitió el procedimiento descrito anteriormente.

Originalmente se había separado la mitad de las muestras para hacer análisis de translocación por medio de microscopia electrónica, pero luego de consideraciones sobre el volumen requerido para el análisis por ICP-MS se decidió reunir todas las muestras y trabajarlas como muestras compuestas. Es decir, todos los pseudotallos de cada tratamiento se juntaron según el tratamiento y el tiempo de exposición, lo mismo para las raíces y las hojas. Al final del muestreo se obtuvo tubos que contenían las partes de las plantas separadas por tratamiento y tiempo de exposición.

Las muestras fueron analizadas usando un SEM Cube-II (EM-Crafts, Corea del Sur), con un voltaje de 10-20 kV y una presión de 7.5×10^{-5} Torr. Las muestras fueron colocadas sobre una cinta de carbón y adherida sobre la parte superior del porta muestras del instrumento. El análisis de espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (por sus siglas en inglés EDS) se llevó a cabo mapeando la muestra usando un Xplore 30 mm (Oxford Instruments) y el software AZteca para el análisis de las imágenes.

3.6. Análisis estadístico

Para analizar los efectos de las AgNPs sobre las plantas se valorizaron los parámetros morfométricos y se utilizó análisis de varianza de una vía con un nivel de confianza de 95% para determinar si existen diferencias entre los tratamientos para las variables longitud de planta, longitud de las raíces, número de raíces y de hojas, peso fresco y peso seco luego de 30 y 60 días de exposición. Adicionalmente, se utilizó la prueba de Shapiro para determinar el supuesto de normalidad y la prueba de Levene y Cochran para determinar la homocedasticidad, ambas con un intervalo de confianza de 95% (Anexo 1). Para determinar donde se encontraban las diferencias entre los tratamientos se utilizó la prueba pareada de Wilcoxon debido a la naturaleza no paramétrica de los datos.

4. Resultados

4.1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata (AgNPs)

La formación de nanopartículas se evidenció mediante la formación de una solución con una coloración amarillenta que es un indicador característico del proceso de reducción de Ag^+ en presencia de quitosano para producir nanopartículas de plata (Ag^0). Los iones de plata de la solución de AgNO_3 se unen a los sitios amino en los monómeros de quitosano luego de un cambio en el pH propiciado por el ácido acético, el cual los vuelve disponibles para la unión de los iones de plata. Luego de la unión de los iones de plata se da un proceso de nucleación para finalizar el proceso de formación de las partículas. En esta reacción el quitosano fue empleado como agente reductor y estabilizante para evitar la agregación de la solución de AgNPs, se logró obtener 100 mL de solución luego de una única síntesis (Figura 1).

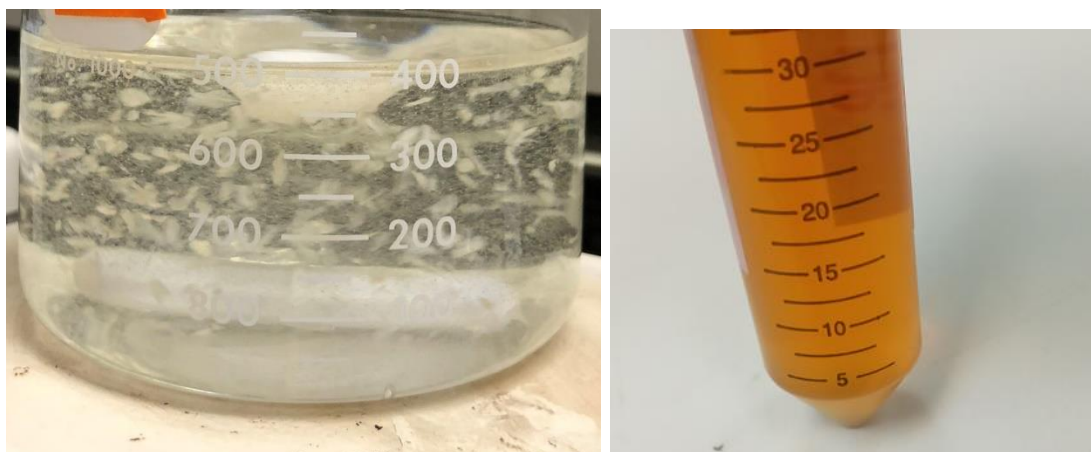


Figura 1: Nanopartículas de plata sintetizadas por medio de síntesis química asistida por autoclave luego de 1 hora de reacción (derecha) y solución de quitosano sin nitrato de plata (izquierda).

El quitosano es un polisacárido biocompatible, biodegradable y de baja toxicidad. El quitosano ha sido usado con agente estabilizante en la síntesis de nanopartículas metálicas debido a la presencia de grupos amino e hidroxilos en la estructura polimérica. Tanto los grupos amino

como los hidroxilos presentan una fuerte afinidad sobre iones metálicos, lo cual favorece la interacción con el metal. Los efectos sobre la reducción de los tamaños de partícula y la forma en función de la concentración y el pH de la disolución de quitosano han sido reportados por Mat Zain y Sibiyah, respectivamente (2014). Bajo las condiciones de reacción ácida (pH 4) reportadas en este estudio, la molécula de quitosano está constituida por grupos amino protonados, los cuales interaccionan con especies cargadas negativamente, mientras que los grupos hidroxilos pueden interaccionar con especies cargadas positivamente (Zain *et al.*, 2014).

Estas interacciones facilitan la mezcla de sales como AgNO_3 con el polímero en disolución a temperatura ambiente y promueve la coordinación de los iones Ag^+ al polímero mediante la interacción con los átomos de oxígeno presentes en la estructura, tal y como lo representa la Figura 2.

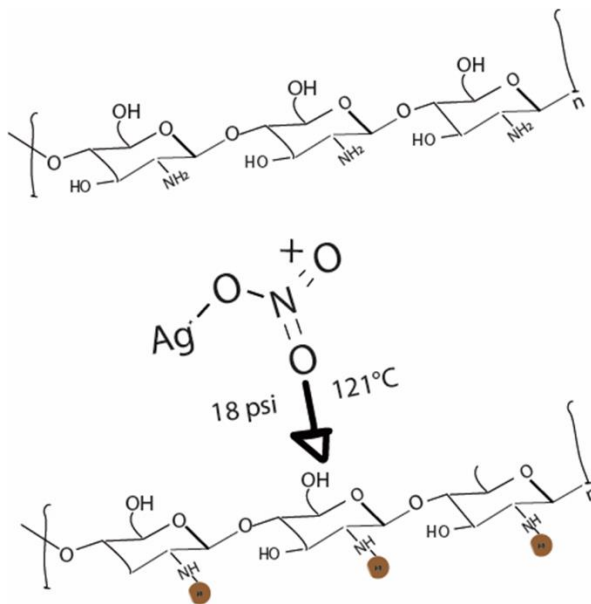


Figura 2: Representación esquemática de la interacción de AgNO_3 y Ag^0 con quitosano en disolución ácida.

La formación de nanopartículas de plata se genera mediante la oxidación del átomo de nitrógeno que pierde un electrón induciendo la reducción de Ag^+ y produciendo Ag^0 .

Adicionalmente, la alta temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción, posiblemente cataliza la reacción de reducción de Ag^+ , resultando en la formación del cristal sobre el par de

electrones del oxígeno del quitosano. Finalmente, las cadenas del polímero proveen de estabilización electrostática a las nanopartículas resultantes.

Esta interacción entre las AgNPs y quitosano puede ser evidenciada por los resultados de potencial zeta, el cual muestra un valor de $+55 \pm 2$ mV, indicando que el polímero de quitosano se encuentra recubriendo las nanopartículas resultantes. Adicionalmente, se reporta un tamaño promedio de 390 ± 53 nm, mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). Bajo las condiciones de reacción se registró una concentración de 2085 ppm de nanopartículas por medio de ICP-MS.

En la Figura 3 se muestra el espectro de absorción de luz UV de la disolución de AgNPs. Como se puede observar, la disolución muestra un único máximo de absorción en 425 nm lo cual es característico de las nanopartículas de plata esféricas.

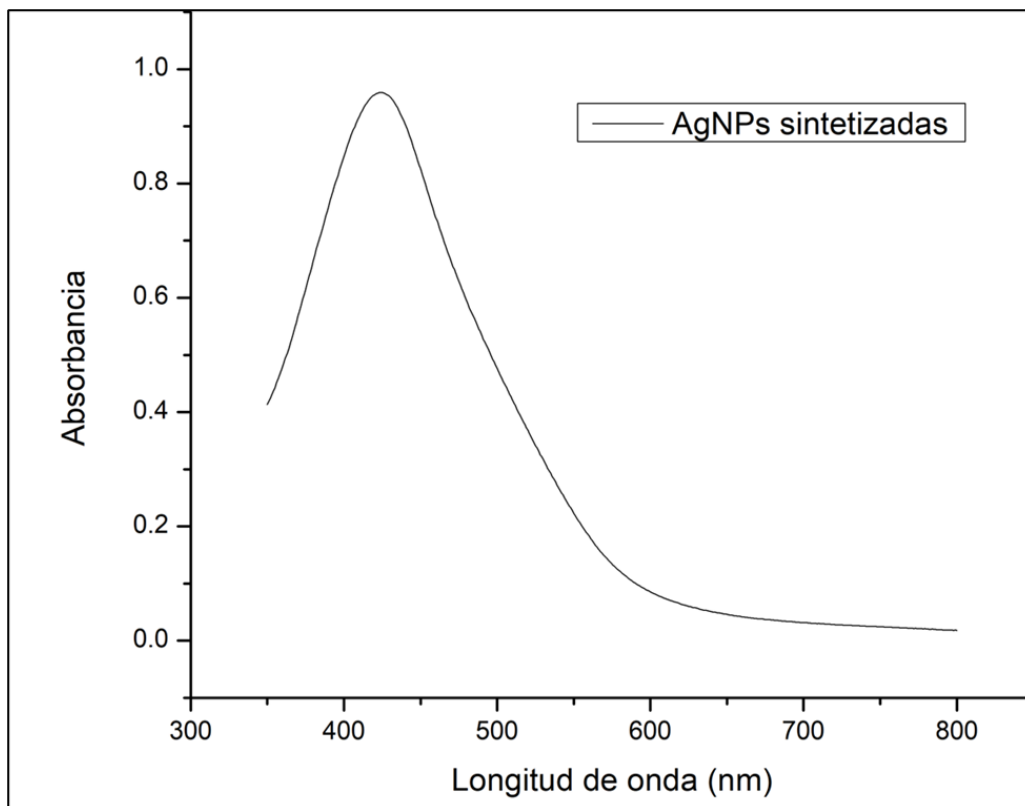


Figura 3: Espectro de absorción de nanopartículas de plata determinado de una muestra de 1 mL de nanopartículas de plata utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta

En la Figura 4 se muestra la micrografía TEM de las nanopartículas de plata sintetizadas. La micrografía muestra partículas esféricas y otras irregulares, sin embargo, estas parecen no estar completamente dispersas o separadas unas de otras. Adicionalmente, es interesante notar que los tamaños registrados por TEM son significativamente menores a los obtenidos por DLS.

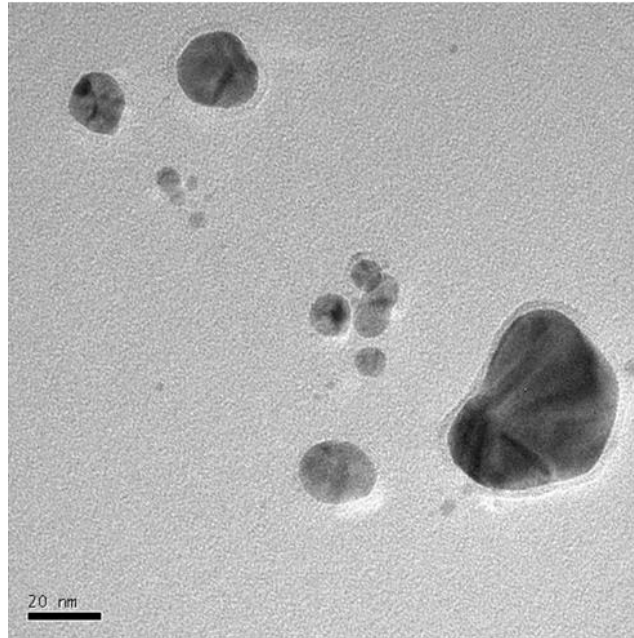


Figura 4: Nanopartículas de plata esféricas sintetizadas por medio de métodos químicos y asistido por autoclave observadas al microscopio TEM

Estas discrepancias podrían ser explicadas tomando en cuenta que la técnica de TEM visualiza únicamente la partícula metálica y no su recubrimiento, mientras que la técnica de DLS reporta el diámetro hidrodinámico que incluye las capas del polímero sobre la superficie de la partícula. Además, las diferencias entre los tamaños reportados pueden estar afectados por la polidispersidad de la muestra, en el cual las partículas de mayor tamaño alteran el coeficiente de difusión de las partículas en dispersión, resultando en desviaciones en el promedio hacia valores mayores.

4.2. Comparación de los métodos de inclusión de las nanopartículas

Se probó la inclusión de las nanopartículas de 2 maneras y en medios de cultivo con dos concentraciones de sales diferentes: 50% m/v y 100% m/v (Figura 5). Primero se intentó incluir las nanopartículas en medio MS al 100% m/v, pero las nanopartículas precipitaron luego del tiempo en autoclave, como se puede ver por la coloración oscura que adoptaron. Luego se intentó filtrarlas hacia el medio de cultivo al 100% m/v, pero se agregaron nuevamente como se puede observar por el depósito de las AgNPs en el medio, evidente por la aparición de turbidez y una ligera coloración naranja proveniente de la solución de NPs que apareció luego de la solidificación del medio y en un punto específico del medio. Por último, se decidió emplear medio MS al 50% m/v, en el cual las nanopartículas se suspendieron sin agregación.

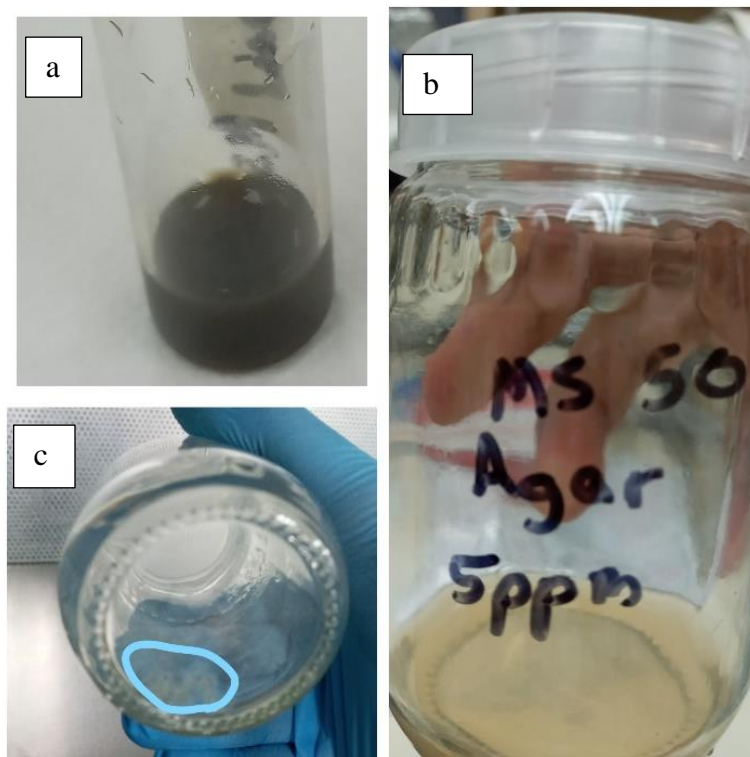


Figura 5: Nanopartículas de plata luego de ser agregadas al medio de cultivo empleando los dos métodos de esterilización: Autoclave y filtración. a) Medio MS al 100% m/v con nanopartículas incorporadas antes de autoclavar, b) Medio MS 50% m/v con Agar y nanopartículas filtradas incorporadas luego de autoclavar, c) Medio MS 100% m/v con Phytigel con nanopartículas incorporadas luego de autoclavar.

4.3. Efectos de las AgNPs sobre parámetros biológicos de las plántulas de banano

Se evaluó los efectos de las nanopartículas de plata sobre los parámetros biológicos de las plántulas de banano luego de 30 días (Cuadro 1) y 60 días de exposición (Cuadro 2). En cuanto a la altura de la planta luego de 30 días de exposición se observó que las plantas tratadas con 5 ppm de AgNPs presentaban ligeramente mayor altura respecto del control. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$). Sobre la longitud de las raíces, se vió que las plantas control presentaban raíces más largas que los otros tratamientos y existían diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos y el control, además las plantas del tratamiento de 5 ppm presentaron raíces significativamente más largas que las plantas del tratamiento de 10 ppm y 15 ppm. En cuanto al número de raíces, las plantas del tratamiento de 10 ppm presentaron un número de raíces ligeramente mayor luego de 30 días de exposición. No obstante, no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$). Respecto del número de hojas en las plantas tratadas con 5 ppm de AgNPs, este fue ligeramente mayor que en el resto de los tratamientos luego de 30 días de exposición, pero no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$).

Cuadro 1: Parámetros biológicos de las plántulas de banano luego de 30 días de exposición

Parámetros	Tratamientos			
	Control	5 ppm	10 ppm	15 ppm
Altura de plantas (cm)	10.60±3.31 ^a	10.65±2.29 ^a	8.92±2.68 ^a	9.29±2.74 ^a
Longitud de raíces (cm)	7.92±2.10 ^a	6.20±2.34 ^b	4.22±2.95 ^c	4.36±2.75 ^c
Número de raíces	4.88±1.36 ^a	4.32±1.55 ^a	4.91±1.20 ^a	3.81±1.53 ^a
Número de hojas	3.08±0.70 ^a	3.18±0.50 ^a	3.04±0.76 ^a	2.81±0.60 ^a

Las letras *a*, *b* y *c* representan las diferencias entre los tratamientos según un ANOVA de una vía y prueba post-hoc pareada de Wilcoxon $p<0.05$.

Luego de 60 días de exposición se observó que, en el caso de la longitud de la planta, las plantas tratadas con 5 ppm de AgNPs presentaron una longitud ligeramente mayor, sin mostrar diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p>0.05$). Los datos registraron que la longitud de las raíces de las plantas de control presentaba mayor longitud de raíces y además las diferencias entre los tratamientos de control, 5, 10 y 15 ppm fueron estadísticamente diferentes ($p<0.05$), no así entre los tratamientos de 10 y 15 ppm, donde no se observó diferencias estadísticamente significativas. Por último, el número de raíces de las plantas tratadas con 15 ppm de AgNPs presentaron un número ligeramente mayor, pero no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$). Luego de 60 días de exposición se observó una tendencia a la reducción significativa del número de hojas conforme se aumentó la concentración de AgNPs.

Cuadro 2: Parámetros biológicos de plántulas de banano luego de 60 días de exposición

Parámetros	Tratamientos			
	Control	5 ppm	10 ppm	15 ppm
Altura de plantas (cm)	11.68±2.67 ^a	12.40±2.58 ^a	10.26±3.06 ^a	10.60±2.72 ^a
Longitud de raíces (cm)	9.86±2.14 ^a	7.14±2.18 ^b	3.99±1.95 ^c	4.12±1.23 ^c
Número de raíces	6.10±1.79 ^a	5.23±2.16 ^a	6.77±3.21 ^a	6.91±2.86 ^a
Número de hojas	4.48±0.98 ^a	4.32±0.65 ^{ab}	4.23±0.81 ^{ab}	3.78±0.80 ^b

Las letras a, b y c representan las diferencias entre los tratamientos según un ANOVA de una vía y prueba post-hoc pareada de Wilcoxon $p<0.05$.

En cuanto a los efectos de las NPs sobre la masa del material fresco luego de 30 días de exposición (Cuadro 3) se observó que las plantas del tratamiento control presentaban mayor biomasa fresca en las raíces, existió diferencias significativas entre el control y los diferentes tratamientos ($p < 0.05$), no así, entre los tratamientos de 10 y 15 ppm, similar a lo encontrado a los 30 días. Por su parte, la masa de los pseudotallos fue mayor en las plantas control y hubo diferencias significativas entre el control y los diferentes tratamientos ($p < 0.05$), sin embargo, los tratamientos de 5, 10 y 15 ppm no presentaron diferencias significativas entre ellos. Por su parte, la biomasa fresca de las hojas de las plantas tratadas con 5 ppm presentó un valor ligeramente mayor, pero no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

Cuadro 3: Efecto de las AgNPs sobre la biomasa fresca luego de 30 días de exposición

Sección de la planta	Tratamientos			
	Control	5 ppm	10 ppm	15 ppm
Raíces (mg)	1421.84±550.50 ^a	599.85±205.38 ^b	450.81±145.41 ^c	412.92±159.52 ^c
Pseudotallo (mg)	1449.18±282.58 ^a	1234.44±228.08 ^b	1259.26±227.46 ^b	1172.63±278.24 ^b
Hojas (mg)	602.8±165.44 ^a	609.1±137.35 ^a	610.43±127.03 ^a	516.43±95.65 ^a

Las letras a, b y c representan las diferencias entre los tratamientos según un ANOVA de una vía y prueba post-hoc pareada de Wilcoxon $p < 0.05$.

Luego de 60 días de exposición (Cuadro 4) se observó que la biomasa fresca de las raíces exhibía un comportamiento similar al de las plantas que estuvieron expuestas durante 30 días. Las plantas de control presentaron raíces más pesadas que los demás tratamientos y hubo diferencias significativas entre las plantas de control y los demás tratamientos ($p < 0.05$), sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las plantas tratadas con 10 y 15 ppm.

Cuadro 4: Efecto de las AgNPs sobre la biomasa fresca luego de 60 días de exposición

Sección de la planta	Tratamientos			
	Control	5 ppm	10 ppm	15 ppm
Raíces (mg)	1427.71±550.91 ^a	770.40±262.80 ^b	542.69±206.21 ^c	539.03±157.81 ^c
Pseudotallo (mg)	1725.84±536.16 ^a	1613.86±186.76 ^a	1519.61±224.65 ^a	1489.77±212.35 ^a
Hojas (mg)	911.16±162.45 ^a	909.96±142.17 ^a	750.41±195.93 ^b	718.73±118.91 ^b

Las letras a, b y c representan las diferencias entre los tratamientos según un ANOVA de una vía y prueba post-hoc pareada de Wilcoxon $p < 0.05$.

En cuanto a la biomasa seca luego de 30 días de exposición (Cuadro 5) se observó que las plantas control presentaban mayor masa seca en las raíces que las plantas tratadas con NPs y existió diferencias significativas entre todos los tratamientos y el control ($p < 0.05$), no así entre los tratamientos de 5, 10 y 15 ppm. La masa seca de los pseudotallos presentó la misma tendencia observada en la biomasa fresca de las plantas expuestas durante 30 días, la cual se pudo evidenciar también en la biomasa seca de las hojas.

Cuadro 5: Efecto de las AgNPs sobre la biomasa seca luego de 30 días de exposición

Sección de la planta	Tratamientos			
	Control	5 ppm	10 ppm	15 ppm
Raíces (mg)	64.23±26.14 ^a	34.80±15.05 ^b	23.83±15.05 ^b	24.98±15.03 ^b
Pseudotallos (mg)	75.48±24.07 ^a	57.59±13.93 ^b	54.48±22.07 ^b	55.87±18.19 ^b
Hojas (mg)	35.23±14.24 ^a	29.66±9.12 ^b	30.82±12.80 ^b	26.46±8.59 ^b

Las letras a, b y c representan las diferencias entre los tratamientos según un ANOVA de una vía y prueba post-hoc pareada de Wilcoxon $p < 0.05$.

Después de 60 días de exposición (Cuadro 6) se presentó un patrón de comportamiento que coincide con lo observado luego de 30 días de exposición. La biomasa seca de las raíces en las plantas control fue superior a la de las plantas tratadas con NPs y además se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control ($p < 0.05$). En cuanto a la masa seca de pseudotallos, de igual manera las plantas de control exhibieron una biomasa ligeramente mayor, pero no se evidenció diferencias entre los tratamientos. Asimismo, la biomasa seca de las hojas de las plantas control fue ligeramente superior a la de las hojas tratadas con 5 ppm de AgNPs, pero no se detectaron diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p > 0.05$). Además, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de 5, 10 y 15 ppm ($p > 0.05$).

Cuadro 6: Efecto de las AgNPs sobre la biomasa seca luego de 60 días de exposición

Sección de la planta	Tratamientos			
	Control	5 ppm	10 ppm	15 ppm
Raíces (mg)	89.21±30.99 ^a	66.68±27.57 ^b	48.06±21.73 ^b	55.10±18.90 ^b
Pseudotallo (mg)	132.30±48.98 ^a	104.03±27.82 ^a	97.74±25.27 ^a	108.57±18.92 ^a

Hojas (mg) 63.18±13.45^a 60.16±8.63^{ab} 50.67±14.01^b 51.17±9.74^b

Las letras a, b y c representan las diferencias entre los tratamientos según un ANOVA de una vía y prueba post-hoc pareada de Wilcoxon $p < 0.05$.

4.4 Absorción y traslocación de las AgNPs en el tejido vegetal

Los cambios en la apariencia de las plantas incubadas a diferentes concentraciones de AgNPs, se evaluaron después de un 60 días de tratamiento. Los resultados más relevantes se registraron en cambios en la apariencia. Se observó que a medida se aumentaba la concentración de las nanopartículas en el medio las raíces presentaban una coloración más oscura y una apariencia más quebradiza (Figura 6). Además, en las concentraciones de 10 ppm y 15 ppm se notó el desarrollo de una cofia (las plantas lo utilizan para lograr penetrar el sustrato).



Figura 6: Raíces de plántulas de banano expuestas a AgNPs en medio de cultivo MS 50% incubadas a 25°C y en un fotoperíodo de 18h luz durante 60 días.

En cuanto a los pseudotallos (Figura 7) se registró que las plantas de control presentaban tallos menos quebradizos y frágiles que los de las plantas tratadas con NPs, además las plantas tratadas presentaban coloración amarillenta. A medida que aumentaba la concentración de plata se notaba un amarillamiento de los tallos y si bien las plantas de 5 ppm desarrollaron más altura, los tallos eran más delgados.

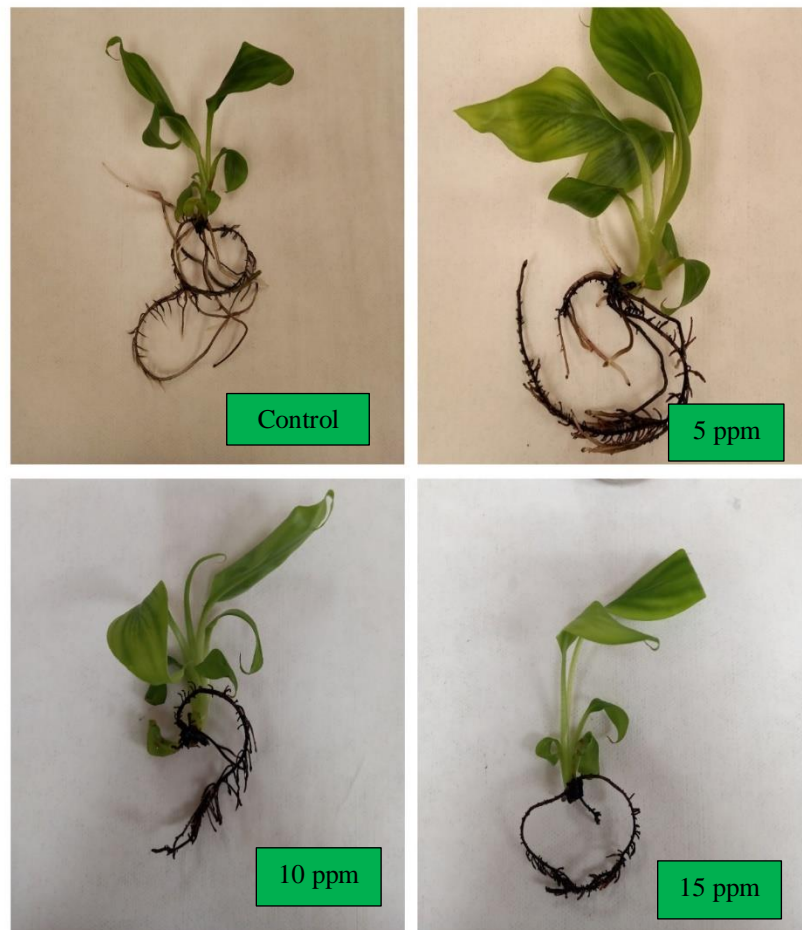


Figura 7: Plántulas de banano luego de 60 días de exposición a AgNPs en medio de cultivo MS 50% incubadas a 25°C y en un fotoperíodo de 18h luz durante 60 días.

En cuanto a la apariencia de las hojas (Figura 8) se observó que las plantas de control manifestaron una coloración verde oscuro, mientras que las plantas tratadas con AgNPs mostraban distintos grados de clorosis (decoloración de las hojas por deficiencia de clorofila). En el caso de esta clorosis, las hojas se mostraban amarillentas en los bordes y en el haz. La venación de las hojas aún se mostraba oscura luego de la exposición.

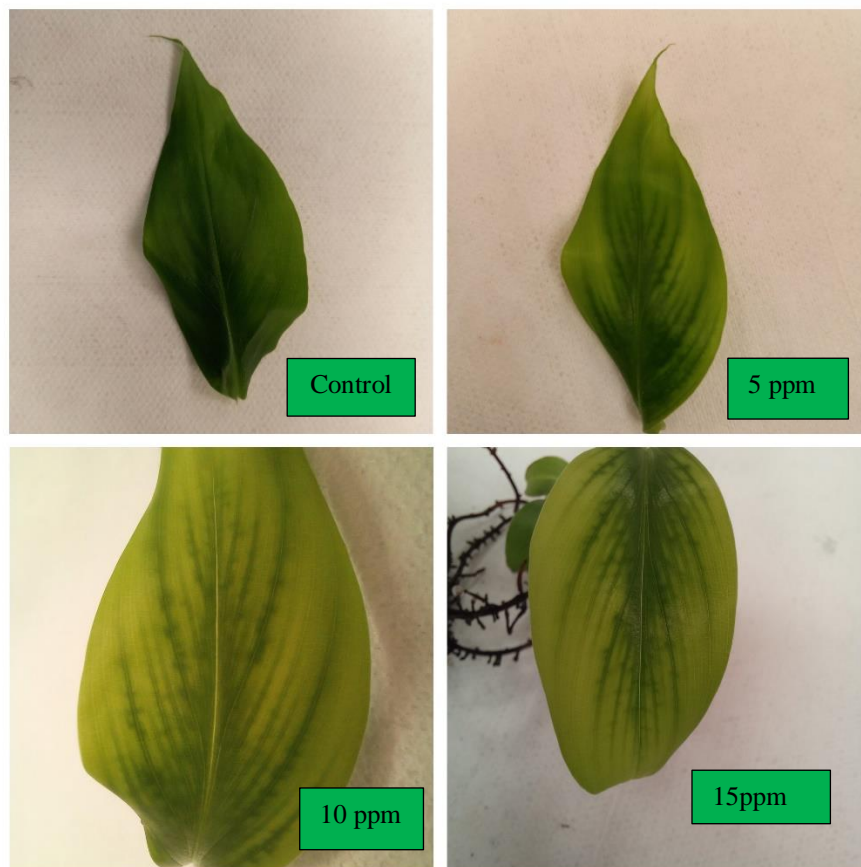


Figura 8: Hojas de plantas de banano luego de dos meses de exposición a AgNPs en medio MS 50% incubadas a 25°C y en un fotoperíodo de 18h luz durante 60 días

La traslocación de las partículas dentro de la planta (Figura 9) se determinó por medio de la medida de la concentración de plata en raíces, pseudotallos y hojas. Se observó que en las plantas tratadas con 5 ppm luego de 30 días de exposición acumuló la mayoría de AgNPs en la raíz y el resto se distribuyó entre pseudotallos y hojas.

Al cabo de 60 días se evidenció una reducción de la concentración en la raíz y un incremento en el pseudotallos y las hojas. Lo anterior es evidencia de que las nanopartículas en la planta migran de la parte basal a las partes aéreas. Por su parte en las plantas tratadas con 10 ppm la mayoría de las NPs se acumularon en el pseudotallo, pero al finalizar los 60 días de exposición se observó una reducción en el pseudotallo y un incremento en la concentración en la raíz. Acerca de las plantas de control, se observó un extraño incremento en la concentración de plata en las raíces. Sin embargo, las micrografías (Figura 10) no muestran presencia de plata en el tejido de raíz, pero sí muestra la superficie porosa por la cual absorben los nutrientes.

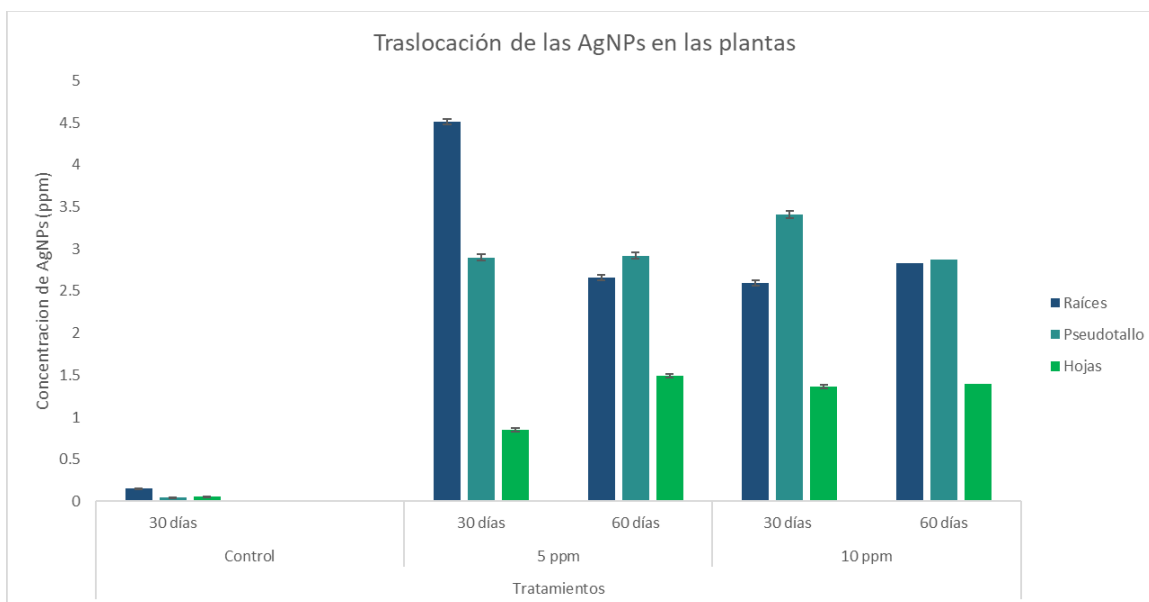


Figura 9: AgNPs acumuladas en las distintas partes de la planta luego de 30 días y 60 días de exposición en medio de cultivo MS 50% y a 25°C y un fotoperiodo de 18h luz.

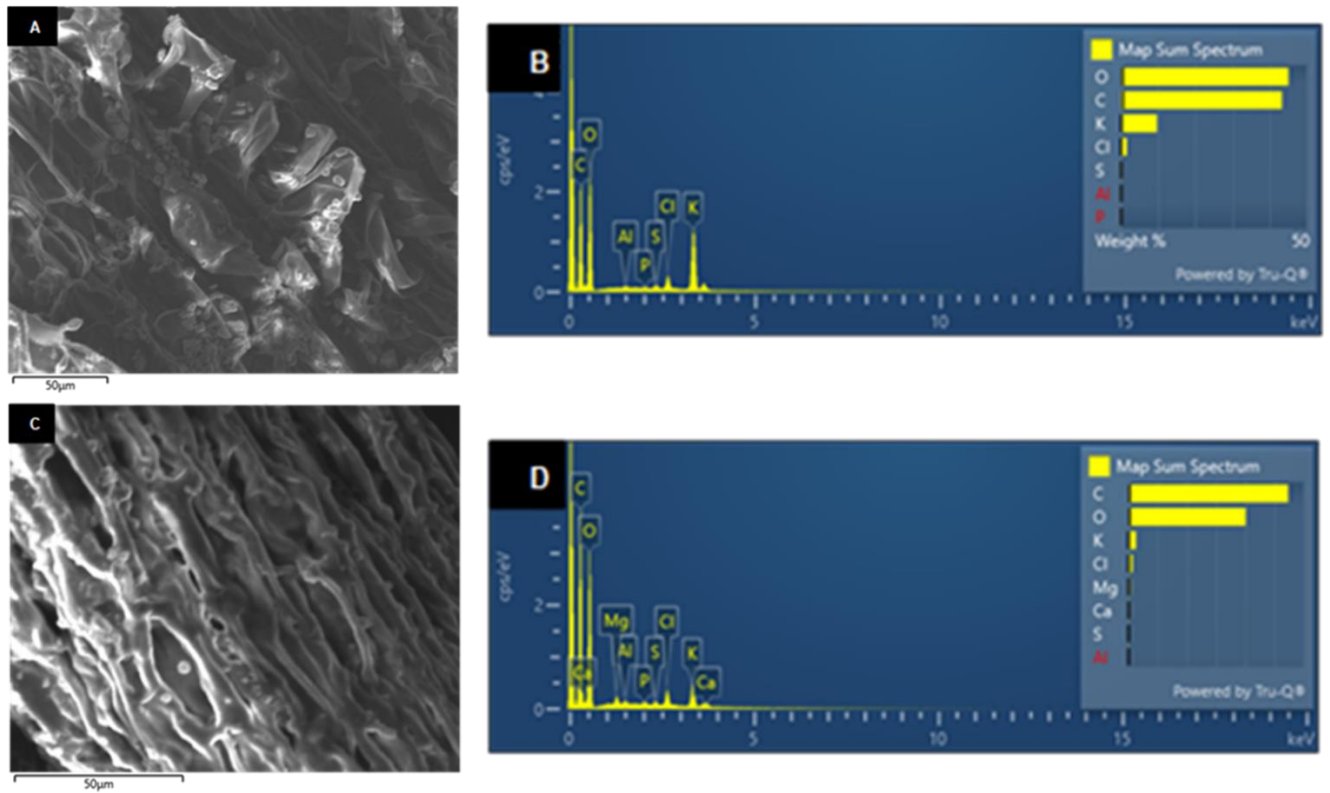


Figura 10: A) Micrografía de SEM para la muestra de Raíz sin adición de AgNPs (control). B) EDS para esta muestra. C) Micrografía SEM de la muestra de Raíz con la adición de 10 mg/ml de AgNPs. D) EDS para esta muestra.

5. Discusión

5.1. Método de síntesis y caracterización de las AgNPs

La síntesis de las AgNPs se llevó a cabo empleando una autoclave a 121°C durante 1 hora. La disolución obtenida luego de la reacción resultó ser una solución de color amarillo lo cual evidencia la formación de AgNPs. De manera similar, Venkatesham y sus colaboradores (2012) reportaron que el tiempo en autoclave es un factor determinante en la conversión de la sal precursora (Ag^{+1}) a nanopartículas (Ag^{+0}) (Figura 2) empleando quitosano como agente reductor (Venkatesham *et al.*, 2012). Mediante la interacción de los grupos amino e hidroxilos con los iones precursores, se favorece la mezcla de reacción y se promueve la coordinación de los iones Ag^{+} al polímero mediante la interacción con los átomos de oxígeno presentes en la estructura. La formación de nanopartículas de plata se genera mediante la oxidación del átomo de nitrógeno que pierde un electrón induciendo la reducción de Ag^{+} y produciendo Ag^0 . Bajo las condiciones de temperatura y presión el proceso podría estar catalizado resultando en la formación del cristal que incorpora progresivamente Ag^0 a la estructura metálica sobre el par de electrones del oxígeno del polímero. Finalmente, los cristales son estabilizados por las cadenas del polímero mediante interacciones electrostáticas.

Al final de la reacción se obtuvo AgNPs con una forma esférica según la micrografía TEM y tamaño de entre 20 nm y 100 nm. Sin embargo, los resultados obtenidos por medio de DLS registraron tamaños de 390 ± 54 nm. Las diferencias pueden ser explicados en términos de la polidispersidad de la muestra que podría desviar los resultados hacia los valores promedios superiores a los 100 nm. Por otro lado, las diferencias obtenidas entre los resultados registrados en TEM y DLS podrían ser explicados considerando que TEM visualiza la partícula metálica mientras que DLS reporta el diámetro hidrodinámico.

Las AgNPs fueron sintetizadas empleando quitosano como agente reductor y encapsulante. El recubrimiento de las AgNPs con quitosano se evidencia en los resultados de potencial zeta, los cuales registran valores con carga superficial positiva ($+55 \pm 2$ mV), similar a lo reportado en la literatura (Mohammed *et al.*, 2017). La forma de las NPs está influenciada por el

método de síntesis utilizado, agentes encapsulantes y reductores, así como la concentración de la sal precursora. Según Arno y sus colaboradores todos estos factores contribuyen en la formación de la NP, lo cual junto con la agitación y temperatura permiten establecer la forma final de estas. Las AgNPs obtenidas en este estudio empleando autoclave resultaron de forma esférica similar a las obtenidas por Arno y sus colaboradores (Arno *et al.*, 2020). El máximo de absorción UV de las nanopartículas de plata obtenidas fue a los 425 nm, característico de AgNPs esféricas (Kokila *et al.*, 2015). Las nanopartículas metálicas en general son muy eficientes para absorber y dispersar la luz. Esto se debe a sus fuertes interacciones con fotones incidentes a través de un fenómeno conocido como resonancia de plasmones superficiales, el cual se define como la oscilación resonante colectiva de los electrones de valencia en una superficie cuando la frecuencia de la luz incidente iguala la frecuencia natural de los electrones (Linic *et al.*, 2011). Sin embargo, la resonancia de plasmones superficiales en nanoestructuras depende de otros factores además del tamaño, como la forma y la constante dieléctrica.

En cuanto al tamaño reportado, existen diferencias entre el registrado por DLS y el detectado por TEM. Estas discrepancias podrían ser explicadas tomando en cuenta que la técnica de TEM visualiza únicamente la partícula metálica y no su recubrimiento, mientras que la técnica de DLS reporta el diámetro hidrodinámico que incluye las capas de polímero sobre la superficie de la partícula. Además, las diferencias entre los tamaños reportados pueden estar afectados por la polidispersidad de la muestra, en el cual las partículas de mayor tamaño alteran el coeficiente de difusión de las partículas en dispersión, resultando en desviaciones en el promedio hacia valores mayores (Gorup *et al.*, 2011).

5.2. Método de inclusión de las nanopartículas de plata

En cuanto a la inclusión de las AgNPs, se notó que el mejor método para lograrlo es agregar las NPs previamente filtradas al medio de cultivo luego de que este se esteriliza por medio de autoclavado. Sin embargo, se requiere de más estudios para determinar cuál es el factor que evita que estas puedan agregarse antes de autoclavar el medio. Por su parte los investigadores que han realizado estudios en plantas en medios de cultivo semisólidos indican que las nanopartículas se agregan al medio antes de ser autoclavado (Liu *et al.*, 2017). Según el estudio de Liu y sus colaboradores y otros como el desarrollado por Shaaban y su equipo (Shaaban *et al.*, 2019) y por Štefanić y sus colegas (Štefanić *et al.*, 2021) con diferentes plantas (tabaco) no debería haber

problemas al agregar las partículas antes de autoclavar, pero puede que el recubrimiento juegue cierto papel, en el caso del estudio de Liu y sus colaboradores (2017) el recubrimiento que utilizan para las NPs es citrato. Sin embargo, durante el experimento se notó que al autoclavar las nanopartículas junto con el medio MS, estas al salir de la autoclave resultaron en una coloración oscura indicando la agregación y posterior precipitación, limitando su utilización en los ensayos con plantas.

Según la literatura, las nanopartículas requieren de calor y cierto pH, según reportes el pH óptimo es alrededor de 6 para poder formarse (Thi Thu Huong *et al.*, 2021). Es posible que al incorporar las partículas al medio antes de autoclavarse, y luego es sometido a 121°C en la autoclave esto puede ocasionar que las nanopartículas reaccionen con las sales en el medio. La concentración de sales incrementa la fuerza iónica de la disolución, induciendo una desestabilización de las nanopartículas de plata recubiertas con el polielectrolito (quitosano) (El Badawy *et al.*, 2010).

5.3. Efectos de la exposición de plántulas de banano a AgNPs

Las plantas de banano se expusieron a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata y se compararon con un control (solo el medio de cultivo sin adicionar AgNPs). Las plantas fueron analizadas en dos intervalos de tiempo (30 y 60 días). El primer parámetro analizado fue la longitud del pseudotallo, según lo reportado en la literatura bajas cantidades de plata demuestran ser beneficiosas para el alargamiento y división celular, puesto que actúan como potenciador de citoquininas (que catalizan el ciclo celular) y auxinas que favorecen el alargamiento de raíces (Debnath *et al.*, 2018). Sin embargo, un factor importante a considerar es el tamaño de partícula. Los estudios realizados implementando AgNPs en cultivo *in vitro* hablan de implementar tamaños cercanos a 20-30 nm (Giap *et al.*, 2018).

En el caso de la presente investigación el tamaño de las NPs fue 10 veces superior al tamaño recomendado. Estudios han revelado que al incrementar el tamaño de partícula se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales modifican la estructura celular y además interfiere con la maquinaria metabólica tanto de cloroplastos como la mitocondria, además de afectar la síntesis de proteínas (Tripathi *et al.*, 2017). Al interferir con el metabolismo, el crecimiento se ve inhibido, por ende, hay menor división celular lo cual puede explicar los

resultados obtenidos en materia de altura del pseudotallo, longitud de raíces y el número de hojas y raíces, parámetros que se vieron reducidos en las concentraciones de 10 y 15 ppm.

En términos de masa de material fresco tanto de pseudotallos como de hoja se observó una tendencia decreciente conforme se aumentó la concentración de AgNPs. Nuevamente el factor que quizá haya contribuido con el desarrollo deficiente de biomasa es el tamaño de las AgNPs. Esta tendencia es especialmente visible en el desarrollo radicular. Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado en la literatura sobre el potencial fitotóxico de la plata (Yan & Chen, 2019). En cuanto al desarrollo radicular, según lo reportado por Yan y Chen (2019) se notó que la exposición a AgNPs inhibe la elongación y el desarrollo de pelos radiculares, lo cual se pudo observar en las plantas de banano tratadas con plata, las plantas tratadas con 10 y 15 ppm exhibieron menos pelos radiculares y menor masa fresca y seca que las plantas tratadas con 5 ppm y las plantas de control.

La apariencia de las raíces en términos de coloración (café) y parte del desarrollo alcanzado por las plantas tratadas con plata puede también ser atribuido a la producción de especies reactivas de oxígeno (Shaaban *et al.*, 2019). De acuerdo con los resultados, al incrementar la concentración de plata la producción de ROS aumenta, lo cual inhibe el crecimiento dado que las ROS interfieren con la maquinaria celular retrasando el metabolismo. En el presente ensayo se evidenció en la forma de reducción de la biomasa y la apariencia de las raíces.

Sobre el efecto de la exposición a las AgNPs en las hojas, se evidenció una tendencia de disminución en biomasa tanto fresca como seca respecto de las plantas control. Esto se podría explicar en términos de la inhibición de la división celular por causa de las AgNPs. Estudios establecen que debido a que las AgNPs reducen el crecimiento radicular hay menor acumulación de nutrientes por parte de la planta, lo cual se traduce en menor división celular y como consecuencia menor producción de biomasa (Scherer *et al.*, 2019). En este experimento se observó que las plantas tratadas con AgNPs manifestaron menor desarrollo de biomasa que las plantas control.

Existen estudios que indican que bajas concentraciones de plata tienen efectos potenciadores sobre el aparato fotosintético (Sadak, 2019). Mientras que, otros estudios han indicado que las AgNPs tienen efectos nocivos sobre el aparato fotosintético (Ke *et al.*, 2018). De acuerdo con Ke y sus colaboradores (2018), al incrementar la concentración de plata en plantas de

tabaco, que se considera una planta modelo, la producción de pigmentos fotosintéticos (clorofilas a y b) se ve inhibida, lo cual refuerza los resultados obtenidos en este estudio.

La reducción en la producción de clorofila se debe a que la producción de ROS interfiere con los fotosistemas, reduciendo la producción de clorofila. Los resultados coinciden con lo reportado por Singh y sus colaboradores (Singh *et al.*, 2015). Según su estudio las nanopartículas de plata pueden penetrar las membranas de los cloroplastos e interrumpir la cadena de transporte de electrones, lo cual resulta en una menor producción de clorofila que a su vez ocasiona la clorosis. Sin embargo, los estudios realizados con AgNPs en plantas no reportan los efectos específicos que ocasionan las cargas superficiales de las partículas.

5.4. Translocación de las nanopartículas a las distintas porciones de las plantas

Según lo reportado en la literatura, el primer punto de entrada de las nanopartículas en los tejidos vegetales es a través del xilema por medio de los espacios existentes entre las células de los pelos radiculares (Ghafariyan *et al.*, 2013). Si bien, las nanopartículas de menor tamaño tienen mejor movilidad a través de los poros celulares, los cuales actúan como filtros y permiten el paso de las partículas más pequeñas, las nanopartículas más grandes pueden contribuir con la formación de poros nuevos, del mismo modo la producción de ROS contribuye a debilitar las paredes celulares (Jiang *et al.*, 2017).

Lo anterior puede explicar cómo las partículas migran de la raíz a las partes aéreas. En los resultados obtenidos en el presente estudio se notó que en el caso de las plantas tratadas con 5 ppm de AgNPs acumularon la mayoría de la plata en la sección de la raíz. Lo anterior coincide con lo reportado por Ghafariyan y sus colaboradores (2013). En su estudio también concluye que una vez dentro de la planta, la plata se mueve a partes aéreas, lo cual explica porque la concentración en el sector de raíz se redujo al cabo de 60 días de exposición. En el presente estudio se observó cambios en la apariencia de las plantas tratadas con plata. En cuanto a las raíces, las plantas tratadas con 10 y 15 ppm se observaron raíces quebradizas y la aparición de la estructura de cofia.

Por su parte tanto pseudotallos como hojas manifestaron clorosis, la cual fue más pronunciada a medida aumentaba la concentración de nanopartículas. Basados en el comportamiento de este tipo de clorosis es posible que se deba a la interacción de los grupos aldehído de la clorofila b con las ROS formadas por la exposición a AgNPs, congruente con lo reportado en la literatura (Fayez *et al.*, 2017).

En la Figura 10 se muestran las micrografías SEM para la muestra de raíz libre de nanopartículas de plata y expuesta a 10 mg/L de AgNPs. Como se puede observar en ambas micrografías, la matriz vegetal presenta una superficie porosa de alrededor de 10-20 micrómetros, en la cual los nutrientes podrían ser absorbidos por la planta. Note que la estructura del tejido vegetal tanto para la raíz libre y expuesta a AgNPs es similar. Adicionalmente, el análisis elemental de las muestras estudiadas se realizó por medio de EDS, en el cual, no se registra la presencia de Ag sobre los tejidos de raíz analizados. Cabe mencionar, otros tejidos (tallos y hojas) también presentaron el mismo comportamiento (Anexo 2). Esto se podría explicar debido la complejidad de la muestra y por la baja concentración de Ag, al nivel de trazas, que la planta podría haber absorbido y no son detectables por el instrumento. Sin embargo, se registra la presencia de otros elementos como carbono, oxígeno, aluminio, azufre, fósforo, entre otros; que probablemente provengan de la composición de matriz vegetal y del medio de cultivo.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las nanopartículas sintetizadas no mejoran el crecimiento de las plantas estudiadas. Se pudo notar que, a una concentración de 5 ppm de nanopartículas, el desarrollo de las plántulas disminuyó considerando una disminución en la biomasa y la longitud de raíces y tallos. Desde este punto de vista la incorporación de nanomateriales en sistemas vegetales puede tener efecto tóxico. Esto es similar a lo encontrado por Fayeze y sus colaboradores (2017) en plantas de cebada. Según su estudio, al incrementar la concentración de NPs en el tejido se observaba menor desarrollo de las plántulas (Fayeze *et al.*, 2017).

Por otro lado, la incorporación de nanopartículas metálicas podría ser una herramienta para evaluar el efecto del agente encapsulante y su interacción con los tejidos vegetales. En este estudio se empleó quitosano como agente encapsulante o vehículo de las AgNPs. De acuerdo con los resultados fue posible determinar por medio de ICP-MS la movilidad de las AgNPs desde la raíz hasta los tejidos superiores (hojas y tallos) concentrándose mayormente en la raíz luego de 30 días de exposición. Esto podría indicar que la interacción del polímero (quitosano) y la pared celular de la planta favorece la absorción del metal y su movilidad dentro del tejido vascular. Asimismo, los resultados sugieren que la planta es capaz de absorber y transportar nanopartículas Ag/quitosano con tamaños promedios de 390 nm. Sin embargo, según estudios realizados por Hu

y sus colaboradores (2018) sobre plantas de trigo (*Triticum aestivum*) el tamaño de nanopartícula influye en la cantidad de nanopartícula que se absorbe. Descubrieron que las NPs de mayor tamaño (240 nm) se absorbían en menor cantidad (Hu *et al.*, 2018).

Sin embargo, estudios argumentan que las nanopartículas metálicas son convenientes para ser aplicadas en otras áreas como remediación de pesticidas y detección de patógenos. En particular las de plata y oro porque son fáciles de detectar en el tejido por medio de distintos métodos (Upadhyayula, 2012). Según los investigadores se puede detectar partículas metálicas empleando métodos como espectroscopía, colorimetría y microscopía. Este último fue empleado en nuestro experimento. La facilidad con la cual las partículas metálicas son detectables las vuelve excelentes marcadores para emplearlos en áreas como detección de patógenos y remediación de pesticidas.

6. Conclusiones y recomendaciones

Los resultados demostraron que el método de síntesis por autoclave de AgNPs es efectivo para producir nanopartículas estériles y en alta concentración utilizables en los ensayos con plantas. En cuanto a los métodos de esterilización se observó que la mejor forma para agregar las NPs es filtrándolas luego de sacar el medio de la autoclave. Se logró evidenciar que las AgNPs en términos de la concentración y el tamaño utilizado presentan efectos nocivos para el desarrollo de plantas de banano Cavendish (*Musa acuminata*) en términos de desarrollo de biomasa, se observó una reducción en el peso fresco y seco de la materia vegetal, así como la elongación del pseudotallos y las raíces. Se logró observar que el órgano donde hubo mayor afectación fue la raíz dado que la diferencia entre los tratamientos fue significativa, coincidiendo con los resultados de acumulación. El estudio sugiere que los efectos a nivel de biomasa pueden estar relacionados con cambios morfológicos y quizá hasta fisiológicos en términos de la clorosis observada en las plantas tratadas y la apariencia de las raíces. Se pudo observar que las nanopartículas son absorbidas del medio a través de la raíz y luego estas son traslocadas a las partes aéreas de la planta. En términos de la forma para realizar el análisis se notó que hubo una limitante en materia de la masa de material seco, puesto que el peso que se obtuvo no fue suficiente para permitir ambos análisis.

Se recomienda realizar el ensayo empleando esquejes de banano en lugar de utilizar plantas ya formadas con el fin de observar con mayor detalle el efecto de la plata y aumentar el número de individuos en cada tratamiento, esto también permitirá solventar el problema de material para poder realizar ambos análisis de detección de AgNPs. En términos de las nanopartículas se recomienda el uso de PVP o citrato como agentes encapsulantes y reductores considerando que el PVP brinda una carga superficial positiva y el citrato una carga negativa, se puede evaluar el efecto de los distintos agentes en materia de la absorción y traslocación en la planta y como estas pueden interactuar al agregarse al medio de cultivo considerando las cargas superficiales. También se recomienda usar NPs de tamaño inferior, entre 10-30 nm, puesto que estas presentan mejor movilidad, para lo cual se podría modificar el método de síntesis incluyendo: disrupción con

sonicador y pasos de filtración a través de poros de tamaños diferentes o realizando otros ajustes en cuanto a la concentración de precursor y encapsulante. Además, se podría modificar la forma que adquieren las nanopartículas y se puede utilizar otros métodos de síntesis (físicos y biológicos). Por otro lado, se recomienda incluir controles adicionales en el ensayo como plata en forma de nitrato (AgNO_3) y quitosano o el agente encapsulante que se utilice para observar los efectos de estas sustancias por separado sobre el crecimiento de banano. Para complementar el análisis se puede incluir el estudio de los efectos sobre los pigmentos fotosintéticos como la producción de clorofila y carotenoides. A nivel agrícola existen cientos de pesticidas que en su formulación incluyen plata como un ingrediente activo, sin embargo, es necesario realizar pruebas con diferentes agentes encapsulantes y métodos de síntesis, los cuales permitan ajustar el tamaño y forma de las nanopartículas para adecuarse al tipo de plaga que se desea eliminar. Podría realizarse ensayos encapsulando distintos reguladores de crecimiento o agroquímicos y estudiar si estos al igual que las AgNPs pueden desplazarse en la planta. Además, pueden ser implementadas en agricultura de precisión para regular la liberación de sustancias.

7. Referencias bibliográficas

- Adedayo, B., Oboh, G., & Olashenid, T. (2016). Antioxidant and Antihyperglycemic Properties of Three Banana Cultivars (*Musa* spp.). *Scientifica*, 2016, 1–7.
- Ahmadov, I. S., Ramazanov, M. A., Gasimov, E. K., Rzayev, F. H., & Veliyeva, S. B. (2020). *The Migration Study of Nanoparticles from Soil to the Leaves of Plants*. 10(5), 6101–6111. <https://doi.org/10.33263/BRIAC105.61016111>
- Al-khattaf, F. S. (2021). Gold and silver nanoparticles: Green synthesis, microbes, mechanism, factors, plant disease management and environmental risks. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(6), 3624–3631. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.03.078>
- Al-Rajhi, A. M. H., Ganash Magdah, A., Alawlaqi, M. M., Helmy, E. A. M., Mabrouk, A. S., Abdelghany, T. M., & Al Abboud, M. A. (2017). Recent Advances in Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications: About Future Directions. A Review. *BioNanoScience*, 8(1), 5–16. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0413-3>
- Anand, A., & Jones, T. J. (2018). *Advancing Agrobacterium-Based Crop Transformation and Genome Modification Technology for Agricultural Biotechnology* (pp. 489–507). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/82_2018_97
- Anna, B., Barbara, K., & Magdalena, O. (2018). How the surface properties affect the nanocytotoxicity of silver? Study of the influence of three types of nanosilver on two wheat varieties. *Acta Physiologiae Plantarum* 2018 40:2, 40(2), 1–7. <https://doi.org/10.1007/S11738-018-2613-Z>
- Arab, M. M., Yadollahi, A., Hosseini-Mazinani, M., & Bagheri, S. (2014). Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on in vitro establishment of G × N15 (hybrid of almond × peach) rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12(2), 103–110. <https://doi.org/10.1016/J.JGEB.2014.10.002>

- Arno, M. C., Inam, M., Weems, A. C., Li, Z., Binch, A. L. A., Platt, C. I., Richardson, S. M., Hoyland, J. A., Dove, A. P., & O'Reilly, R. K. (2020). Exploiting the role of nanoparticle shape in enhancing hydrogel adhesive and mechanical properties. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15206-y>
- Bagherzadeh Homaei, M., & Ehsanpour, A. A. (2015). Physiological and biochemical responses of potato (*Solanum tuberosum*) to silver nanoparticles and silver nitrate treatments under in vitro conditions. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20(4), 353–359. <https://doi.org/10.1007/s40502-015-0188-x>
- Baird, R. B., Eaton, A. D., & Rice, E. W. (2018). 3125 Metals by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. In *Standard Methods for Examinations of Water and Wastewater* (23rd ed., pp. 3–49). American Public Health Association Water Environment Federation. <https://doi.org/10.2105/smww.2882.048>
- Balakrishnan, S., Wickramasinghe, G., & Wijayapala, U. S. (2019). Investigation on improving banana fiber fineness for textile application. *Textile Research Journal*, 004051751983575. <https://doi.org/10.1177/0040517519835758>
- Bouwmeester, H., Heuvelink, G. B. M., & Stoorvogel, J. J. (2016). Mapping crop diseases using survey data: The case of bacterial wilt in bananas in the East African highlands. *European Journal of Agronomy*, 74, 173–184. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.12.013>
- Capaldi Arruda, S. C., Diniz Silva, A. L., Moretto Galazzi, R., Antunes Azevedo, R., & Zezzi Arruda, M. A. (2015). Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta*, 131, 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.050>
- Choudhary, P., Khandelwal, V., & Bhatia, A. (2018). Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Callus Induction of Banana under Salt Stress Condition. *Journal of Engineering Technology Science and Research*, 5(4), 1015–1018.
- CORBANA. (2020). *Banano de Costa Rica – Corbana*. Corbana. <https://www.corbana.co.cr/banano-de-costa-rica/#estadistica>

- Cvjetko, P., Zovko, M., Štefanić, P. P., Biba, R., Tkalec, M., Domijan, A.-M., Vrček, I. V., Letofsky-Papst, I., Šikić, S., & Balen, B. (2018). Phytotoxic effects of silver nanoparticles in tobacco plants. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*, 5590–5602. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0928-8>
- Dahabieh, M. S., Bröring, S., & Maine, E. (2018). Overcoming barriers to innovation in food and agricultural biotechnology. *Trends in Food Science & Technology*, *79*, 204–213. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.07.004>
- Dalakouras, A., Wassenegger, M., Dadami, E., Ganopoulos, I., Pappas, M. L., & Papadopoulou, K. (2020). Genetically Modified Organism-Free RNA Interference: Exogenous Application of RNA Molecules in Plants. *Plant Physiology*, *182*(1), 38–50. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00570>
- Debnath, P., Mondal, A., Hajra, A., Das, C., & Mondal, N. K. (2018). Cytogenetic effects of silver and gold nanoparticles on *Allium cepa* roots. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *16*(2), 519–526. <https://doi.org/10.1016/J.JGEB.2018.07.007>
- Deuter, P., White, N., & Putland, D. (2012). *Critical temperature thresholds Case study Banana*.
- Dhand, C., Dwivedi, N., Jun Loh, X., Ng Jie Ying, A., Kumar Verma, N., Roger Beuerman, ad W., Rajamani Lakshminarayanan, A., Ramakrishna, S., Authors, C., Lakshminaryanan, R., & Beuerman, R. W. (2016). *Methods and Strategies for the Synthesis of Diverse Nanoparticles and their Applications: A Comprehensive Overview*. <https://doi.org/10.1039/C5RA19388E>
- Dhir, B. (2021). Nanomaterials for Remediation of Pesticides. In *New Frontiers of Nanomaterials in Environmental Science* (pp. 193–200). https://doi.org/10.1007/978-981-15-9239-3_1
- Domokos-Szabolcsy, E., Marton, L., Sztrik, A., Babka, B., Prokisch, J., & Fari, M. (2012). Accumulation of red elemental selenium nanoparticles and their biological effects in *Nicotinia tabacum*. *Plant Growth Regulation*, *68*, 525–531.
- Duhan, J. S., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P., Nehra, K., & Duhan, S. (2017). Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports*, *15*(1), 11–23. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2017.03.002>

- El Badawy, A. M., Luxton, T. P., Silva, R. G., Scheckel, K. G., Suidan, M. T., & Tolaymat, T. M. (2010). Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environmental Science and Technology*, 44(4), 1260–1266. https://doi.org/10.1021/ES902240K/SUPPL_FILE/ES902240K_SI_001.PDF
- El-Mahdy, M. T. K., Radi, A. A., & Shaaban, M. (2019). Impacts of exposure of banana to silver nanoparticles and silver ions in vitro. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 09(03), 727–740.
- Eshak, N. S. (2016). Sensory evaluation and nutritional value of balady flat bread supplemented with banana peels as a natural source of dietary fiber. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(2), 229–235. <https://doi.org/10.1016/J.AOAS.2016.07.002>
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Falco, W. F., Scherer, M. D., Oliveira, S. L., Wender, H., Colbeck, I., Lawson, T., & Caires, A. R. L. (2019). Phytotoxicity of silver nanoparticles on *Vicia faba*: evaluation of particle size effects on photosynthetic performance and leaf gas exchange Phytotoxicity of silver nanoparticles on *Vicia faba*: evaluation of particle size effects on pho. In *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134816>
- FAO. (2020a). *EST: Banana exports and imports*. <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/banana-exports/en/>
- FAO. (2020b). *Situación del mercado del banano*.
- 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* 2017 39:7, 39(7), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S11738-017-2452-3>
- Frank, M. H., Edwards, M. B., Schultz, E. R., Mckain, M. R., Fei, Z., Sørensen, I., Rose, J. K. C., & Scanlon, M. J. (2015). Dissecting the molecular signatures of apical cell-type shoot

- meristems from two ancient land plant lineages. *New Phytologist*, 207, 893–904. <https://doi.org/10.1111/nph.13407>
- Ghafariyan, M., Malakouti, M., & Dadpour, M. (2013). Effects of Magnetite Nanoparticles on Soybean Chlorophyll. *Environmental Science and Technology*, 47(18), 10645–10642. <https://doi.org/10.1021/es402249b>
- Giap, D., Thuy, T. K., Trang, T. H., Duoc, T., Tuan, T., & Hieu, D. (2018). Effects of nano silver on the growth of banana (*Musa spp.*) cultured in vitro. 10(2), 92–98. <https://doi.org/10.13141/jve.vol10.no2.pp92-98>
- Gorup, L. F., Longo, E., Leite, E. R., & Camargo, E. R. (2011). Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 360(2), 355–358. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2011.04.099>
- Gumustas, M., Sengel-Turk, C. T., Gumustas, A., Ozkan, S. A., & Uslu, B. (2017). Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*, 67–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52725-5.00005-8>
- Hu, T., Li, H., Li, J., Zhao, G., Wu, W., Liu, L., Wang, Q., & Guo, Y. (2018). Absorption and bio-transformation of selenium nanoparticles by wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 9, 597. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00597/BIBTEX>
- Hubbard, J. D., Lui, A., & Landry, M. P. (2020). Multiscale and multidisciplinary approach to understanding nanoparticle transport in plants. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 30, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2020.100659>
- Isah, T., Umar, S., Mujib, A., Sharma, M. P., Rajasekharan, P. E., Zafar, N., & Fruk, A. (2018). Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132(2), 239–265. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1332-2>

- Jamaludin, A., & Faizal, C. K. M. (2017). Autoclave-Assisted Synthesis of Silver Nanoparticles using Metroxylon Sagu for Antibacterial Applications. *Indian Journal of Science and Technology*, 10(6), 1–5.
- Jasim, B., Thomas, R., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2017). Plant growth and diosgenin enhancement effect of silver nanoparticles in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(3), 443–447. <https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2016.09.012>
- Jiang, H. S., Yin, L. Y., Ren, N. N., Zhao, S. T., Li, Z., Zhi, Y., Shao, H., Li, W., & Gontero, B. (2017). Silver nanoparticles induced reactive oxygen species via photosynthetic energy transport imbalance in an aquatic plant. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1278802>, 11(2), 157–167. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1278802>
- Kale, S. K., Parishwad, G. V., Husainy, A. S. N., & Patil, A. S. (2021). ES Food and Agroforestry Emerging Agriculture Applications of Silver Nanoparticles. *ES Food Agrofor*, 3, 17–22. <https://doi.org/10.30919/esfaf438>
- Kaplin, V. A., Francis, B. A., & Nsabimana, F. (2017). A comparative study between sampling methods for soil litter arthropods in conserved tree plots and banana crop plantations in Rwanda. In *International Journal of Development and Sustainability* (Vol. 6, Issue 8).
- Kashyap, P., Dodke, B., Moon, A., Kalode, D., & Jaunjare, L. (2018). A review on banana plant: A boon to humankind. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 7(13), 250–258. <https://doi.org/10.20959/wjpr201813-12727>
- Ke, M., Qu, Q., Peijnenburg, W. J. G. M., Li, X., Zhang, M., Zhang, Z., Lu, T., Pan, X., & Qian, H. (2018). Phytotoxic effects of silver nanoparticles and silver ions to *Arabidopsis thaliana* as revealed by analysis of molecular responses and of metabolic pathways. *Science of The Total Environment*, 644, 1070–1079. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.07.061>
- Kishor, H., Abhijith, Y. C., & Manjunatha, N. (2018). Micropropagation of Native Cultivars of Banana- A Critical Review. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 5(5), 1559–1564. <https://doi.org/10.18782/2320-7051.5209>
- Kokila, T., Ramesh, P. S., & Geetha, D. (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles from Cavendish banana peel extract and its antibacterial and free radical scavenging assay: a novel

- biological approach. *Applied Nanoscience*, 5(8), 911–920. <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0401-2>
- Kumar Rana, G., Singh, Y., Mishra, S. P., & Rahangdale, H. K. (2018). Potential Use of Banana and Its By-products: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(06), 1827–1832. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.706.218>
- Kumari, S., V, K. R., Sharma, G., Chandra Choudhary, R., Kumaraswamy, R., Kumar, A., Budhwar, S., Pal, A., Raliya, R., Biswas, P., & Saharan, V. (2019). Chitosan Nanomaterials for Smart Delivery of Bioactive Compounds in Agriculture. In *Nanoscale Engineering in Agricultural Management*.
- Kurczyńska, E., Godel-Jędrychowska, K., Sala, K., & Milewska-Hendel, A. (2021). Nanoparticles—Plant Interaction: What We Know, Where We Are? *Applied Sciences 2021*, Vol. 11, Page 5473, 11(12), 5473. <https://doi.org/10.3390/APP11125473>
- Landrum, A. R., Hilgard, J., Lull, R. B., Akin, H., & Hall Jamieson, K. (2018). Open and transparent research practices and public perceptions of the trustworthiness of agricultural biotechnology organizations. *Journal of Science Communication*, 17(02), A04. <https://doi.org/10.22323/2.17020204>
- Li, C., Liu, G., Nges, I. A., Deng, L., Nistor, M., & Liu, J. (2016). Fresh banana pseudo-stems as a tropical lignocellulosic feedstock for methane production. *Energy, Sustainability and Society*, 6(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13705-016-0093-9>
- Linic, S., Christopher, P., & Ingram, D. B. (2011). Plasmonic-metal nanostructures for efficient conversion of solar to chemical energy. *Nature Materials 2011 10:12*, 10(12), 911–921. <https://doi.org/10.1038/nmat3151>
- Liu, G., Zhang, M., Jin, Y., Fan, X., Xu, J., Zhu, Y., Fu, Z., Pan, X., & Qian, H. (2017). The Effects of Low Concentrations of Silver Nanoparticles on Wheat Growth, Seed Quality, and Soil Microbial Communities. *Water, Air, & Soil Pollution 2017 228:9*, 228(9), 1–12. <https://doi.org/10.1007/S11270-017-3523-1>
- Lv, J., Christie, P., & Zhang, S. (2019). Uptake, translocation, and transformation of metal-based nanoparticles in plants: recent advances and methodological challenges *Environmental*

Science Nano CRITICAL REVIEW Uptake, translocation, and transformation of metal-based nanoparticles in plants: recent advances and methodological challenges †. *Cite This: Environ. Sci.: Nano*, 6, 41. <https://doi.org/10.1039/C8EN00645H>

Mathew, N. S., & Negi, P. S. (2017). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of wild banana (*Musa acuminata* Colla): A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 196, 124–140. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.009>

Medina, M. A., Lorena Medina, C., & Karime Medina, L. (2015). Propagación in vitro de *Musa acuminata* (Simmunds) plátano bocadillo del Chocó, Colombia, a partir del cultivo de meristemas apicales In vitro propagation *Musa acuminata* (Simmunds) plátano bocadillo of Chocó, Colombia, from apicals meristems culture. *Biodiversidad Neotropical*, 5(1), 47–53.

Mehrazar, E., Rahaie, M., & Rahaie, S. (2015). Application of nanoparticles for pesticides, herbicides, fertilisers and animals feed management. *International Journal of Nanoparticles*, 8(1), 1–19. <https://doi.org/10.1504/IJNP.2015.070339>

Mohammed, M. A., Syeda, J. T. M., Wasan, K. M., & Wasan, E. K. (2017). An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics* 2017, Vol. 9, Page 53, 9(4), 53. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS9040053>

Pemartin-Biernath, K., Vela-González, A., Moreno-Trejo, M., Leyva-Porras, C., Castañeda-Reyna, I., Juárez-Ramírez, I., Solans, C., Sánchez-Domínguez, M., Pemartin-Biernath, K., Vela-González, A. V., Moreno-Trejo, M. B., Leyva-Porras, C., Castañeda-Reyna, I. E., Juárez-Ramírez, I., Solans, C., & Sánchez-Domínguez, M. (2016). Synthesis of Mixed Cu/Ce Oxide Nanoparticles by the Oil-in-Water Microemulsion Reaction Method. *Materials*, 9(6), 480. <https://doi.org/10.3390/ma9060480>

Pittol, M., Tomacheski, D., Simões, D. N., Ribeiro, V. F., & Santana, R. M. C. (2017). Macroscopic effects of silver nanoparticles and titanium dioxide on edible plant growth. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 8, 127–133. <https://doi.org/10.1016/J.ENMM.2017.07.003>

Raja, K., Sowmya, R., Sudhagar, R., Moorthy, Pon. S., Govindaraju, K., & Subramanian, K. S. (2019). Biogenic ZnO and Cu nanoparticles to improve seed germination quality in

- blackgram (Vigna mungo). *Materials Letters*, 235, 164–167.
<https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2018.10.038>
- Rani, A., & Kumar, S. (2017). *Tissue culture as a plant production technique for medicinal plants: A review*. 6(1), 784–795.
- Ruta, C., De Mastro, G., Ancona, S., Tagarelli, A., De Cillis, F., Benelli, C., & Lambardi, M. (2020). Large-Scale Plant Production of Lycium barbarum L. by Liquid Culture in Temporary Immersion System and Possible Application to the Synthesis of Bioactive Substance. *Plants*, 9(7), 844. <https://doi.org/10.3390/plants9070844>
- Sadak, M. S. (2019). Impact of silver nanoparticles on plant growth, some biochemical aspects, and yield of fenugreek plant (Trigonella foenum-graecum). *Bulletin of the National Research Centre 2019 43:1*, 43(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S42269-019-0077-Y>
- Safavi, K. (2014). Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles in Plant Tissue Culture Media for Enhance Resistance to Bacterial Activity. *Environmental. Pharmacology. Life Sciences*, 3, 163–166.
<https://doi.org/10.1155/2012/964381>
- Salavati-Niasari, M., Soofivand, F., Sobhani-Nasab, A., Shakouri-Arani, M., Faal, A. Y., & Bagheri, S. (2016). Synthesis, characterization, and morphological control of ZnTiO₃ nanoparticles through sol-gel processes and its photocatalyst application. *Advanced Powder Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2016.07.018>
- Sandoval, J., Hernandez, J. B. P., Rangel, A., Rocha, H. S., Galan, V., & Lopez, J. (2018). Propagación del banano: técnicas tradicionales, nuevas tecnologías e innovaciones. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40(4). <https://doi.org/10.1590/0100-29452018574>
- Scherer, M. D., Sposito, J. C. V., Falco, W. F., Grisolia, A. B., Andrade, L. H. C., Lima, S. M., Machado, G., Nascimento, V. A., Gonçalves, D. A., Wender, H., Oliveira, S. L., & Caires, A. R. L. (2019). Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of Allium cepa roots: A close analysis of particle size dependence. *Science of The Total Environment*, 660(April 2019), 459–467.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.12.444>

- Servin, A., Elmer, W., Mukherjee, A., De la Torre-Roche, R., Hamdi, H., White, J. C., Bindraban, P., & Dimkpa, C. (2015). A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(92), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-2907-7>
- Shaaban, M. M., El-Mahdy, M. T. K., & Radi, A. A. (2019). Impacts of exposure of banana to silver nanoparticles and silver ions in vitro. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 9(3), 727–740.
- Shukla, M. R., Piunno, K., Saxena, P. K., & Jones, A. M. P. (2020). Improved in vitro rooting in liquid culture using a two-piece scaffold system. *Engineering in Life Sciences*, 20(3–4), 126–132. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900133>
- Siddiqui, M. H., Al-Wahaibi, M. H., & Mohammad, F. (2015). Preface. *Nanotechnology and Plant Sciences: Nanoparticles and Their Impact on Plants*, v–vi. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0>
- Singh, C. R. (2018). Review on Problems and its Remedy in Plant Tissue Culture. *Asian Journal of Biological Sciences*, 1–8. <https://doi.org/10.3923/ajbs.2018.165.172>
- Singh, Kaushal, S., & Sodhi, R. S. (2020). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. WUC 59 cell-free extract and their effects on bacterial growth and seed germination. *Nanoscale Advances*, 2(9), 3972–3982. <https://doi.org/10.1039/D0NA00357C>
- Singh, Singh, N. B., Hussain, I., Singh, H., & Singh, S. C. (2015). Plant-nanoparticle interaction: An approach to improve agricultural practices and plant productivity. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 4(8), 2319–6718.
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Haida, N., Kaus, M., Chuo, L., Siti, A. •, Mohd Bakhori, K., Hasan, H., Mohamad, D., Sirelkhatim, A., Mahmud, Á. S., Ann, Á. L. C., Bakhori, Á. S. K. M., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Hasan, H., & Mohamad, D. (2015). Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3), 219–242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>

- Sj, P., Nb, P., & Ka, P. (2018). Yield and economics of banana Cv. grand nain influenced by foliar spray of water soluble fertilizes on banana bunch. *International Journal of Chemical Studies*, 6(6), 1914–1916.
- Spinoso-Castillo, J. L., Chavez-Santoscoy, R. A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J. A., Morales-Ramos, V., & Bello-Bello, J. J. (2017). Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 2017* 129:2, 129(2), 195–207. <https://doi.org/10.1007/S11240-017-1169-8>
- Štefanić, P. P., Košpić, K., Lyons, D. M., Jurković, L., Balen, B., & Tkalec, M. (2021). Phytotoxicity of Silver Nanoparticles on Tobacco Plants: Evaluation of Coating Effects on Photosynthetic Performance and Chloroplast Ultrastructure. *Nanomaterials 2021, Vol. 11, Page 744*, 11(3), 744. <https://doi.org/10.3390/NANO11030744>
- Syu, Y., Hung Hung, J., Chang Chen, J., & wen Chuang Huey. (2014). Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 57–64.
- Taha, R. A., Hassan, M. M., Ibrahim, E. A., Abou Baker, N. H., & Shaaban, E. A. (2016). Carbon nanotubes impact on date palm in vitro cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127(2), 525–534. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1058-6>
- Thi Thu Huong, B., Dang Xuan, T., Truong, K., & Dang Khanh, T. (2021). INFLUENCES OF SILVER NANOPARTICLES In vitro MORPHOGENESIS OF SPECIALTY KING BANANA (*Musa ssp.*) IN VIETNAM. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 22(33 & 34), 163–175.
- Tripathi, L., Ntui, V. O., & Tripathi, J. N. (2020). CRISPR/Cas9-based genome editing of banana for disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 56, 118–126. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2020.05.003>
- Tripathi, Tripathi, A., Shweta, Singh, S., Singh, Y., Vishwakarma, K., Yadav, G., Sharma, S., Singh, V. K., Mishra, R. K., Upadhyay, R. G., Dubey, N. K., Lee, Y., & Chauhan, D. K. (2017). Uptake, Accumulation and Toxicity of Silver Nanoparticle in Autotrophic Plants, and

- Heterotrophic Microbes: A Concentric Review. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 1–16. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00007>
- Upadhyayula, V. K. K. (2012). Functionalized gold nanoparticle supported sensory mechanisms applied in detection of chemical and biological threat agents: A review. *Analytica Chimica Acta*, 715, 1–18. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2011.12.008>
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella, M. F., Rejeski, D., & Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6, 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
- Venkatesham, M., Ayodhya, D., Madhusudhan, A., Veera Babu, N., & Veerabhadram, G. (2012). A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies. *Applied Nanoscience* 2012 4:1, 4(1), 113–119. <https://doi.org/10.1007/S13204-012-0180-Y>
- Vidyalakshmi, N., Thomas, R., Aswani, R., Gayatri, G. P., Radhakrishnan, E. K., & Remakanthan, A. (2017). Comparative analysis of the effect of silver nanoparticle and silver nitrate on morphological and anatomical parameters of banana under in vitro conditions. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 47(11), 1530–1536. <https://doi.org/10.1080/24701556.2017.1357605>
- Vincent, L., & Anushma, P. L. (2018). Micropropagation in Banana Using Inflorescence: A Review. *Journal of Cell and Tissue Research*, 18(3), 6573–6582.
- Vives, K., Andújar, I., Lorenzo, J. C., Concepción, O., Hernández, M., & Escalona, M. (2017). Comparison of different in vitro micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT®). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131(1), 195–199. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1258-8>
- Warghat, A. R., Thakur, K., & Sood, A. (2018). Plant stem cells: what we know and what is anticipated. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 2897–2905. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4344-z>

- Whittaker, M. R., & Mak, C. (2015). The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert Opinion Drug Delivery*, 12(1), 129–138. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.950564>
- Wiesner, M. R., Schnoor, J. L., Schwab, F., Turner, A., Kern, M., & Zhai, G. (2015). Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants – Critical review. *Nanotoxicology*, 5390(Figure 1), 1–22. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1048326>
- Wolfram, J., Zhu, M., Yang, Y., Shen, J., Gentile, E., Paolino, D., Fresta, M., Nie, G., Chen, C., Shen, H., Ferrari, M., & Zhao, Y. (2015). Safety of Nanoparticles in Medicine. *Current Drug Targets*, 16(14), 1671–1681.
- World to Exports. (2017). *Bananas Exports by Country*. Banana Exports by Country. <http://www.worldstopexports.com/bananas-exports-country/>
- Yan, A., & Chen, Z. (2019). Impacts of Silver Nanoparticles on Plants: A Focus on the Phytotoxicity and Underlying Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 1003, 20(5), 1003. <https://doi.org/10.3390/IJMS20051003>
- Yin, L., Colman, B. P., McGill, B. M., Wright, J. P., & Bernhardt, E. S. (2012). Effects of Silver Nanoparticle Exposure on Germination and Early Growth of Eleven Wetland Plants. *PLoS ONE*, 7(10), 47674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047674>
- Zain, N. M., Stapley, A. G. F., & Shama, G. (2014). Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications. *Carbohydrate Polymers*, 112, 195–202. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.05.081>
- Zainul, M., Kamaluddin, U., & Ali, A. (2017). Plant Biotechnology: Principles and Applications. In M. Zainul, U. Kamaluddin, & A. Ali (Eds.), 2017. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5>
- Zhang, Dan, Y., Shi, H., & Ma, X. (2016). *Elucidating the Mechanisms for Plant Uptake and in-planta Speciation of Cerium in Radish (Raphanus sativus L.) Treated with Cerium Oxide Nanoparticles*.

Zhang, H., Chen, S., Jia, X., Huang, Y., Ji, R., & Zhao, L. (2021). Comparison of the phytotoxicity between chemically and green synthesized silver nanoparticles. *Science of The Total Environment*, 752, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.142264>

8. Anexos

1. Resultados de las pruebas estadísticas para comprobar los supuestos y toma de decisión sobre las pruebas a ejecutar

Plantas luego de 1 mes de exposicion				
Parametro	valor de p Prueba de Shapiro	valor de p prueba de homocedasticidad	Decision de ANOVA	Prueba Post-hoc
Longitud de raices	0.04451	0.007652	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Altura de pseudotallo	0.1538	0.2011	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Numero de Raices	0.04166	0.8803	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Numero de hojas	2.67E-06	0.3024	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Masa Fresca Raices	0.0003217	8.82E-14	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Masa Fresca pseudotallo	0.5939	0.7266	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Masa Fresca Hojas	0.02084	0.1144	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Masa Seca Raices	0.002383	0.0001561	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Masa Seca Pseudotallo	0.0812	0.268	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Masa Seca Hojas	0.006649	0.1103	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Plantas luego de 2 meses de exposicion				
Parametro	valor de p Prueba de Shapiro	valor de p prueba de homocedasticidad	Decision de ANOVA	Prueba Post-hoc
Longitud de raices	0.0035	0.725	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Altura de pseudotallo	0.06956	0.8835	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Numero de Raices	0.001566	0.09667	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Numero de hojas	0.05456	0.2318	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Masa Fresca Raices	4.86E-05	8.34E-09	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Masa Fresca pseudotallo	7.37E-07	9.87E-09	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Masa Fresca Hojas	0.4234	0.04984	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Masa Seca Raices	0.06043	0.1463	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Masa Seca Pseudotallo	0.003494	3.25E-05	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon
Masa Seca Hojas	0.9028	0.09958	Anova no parametrico	Prueba de Wilcoxon

2. Imágenes de micrografía de las diferentes secciones vegetales

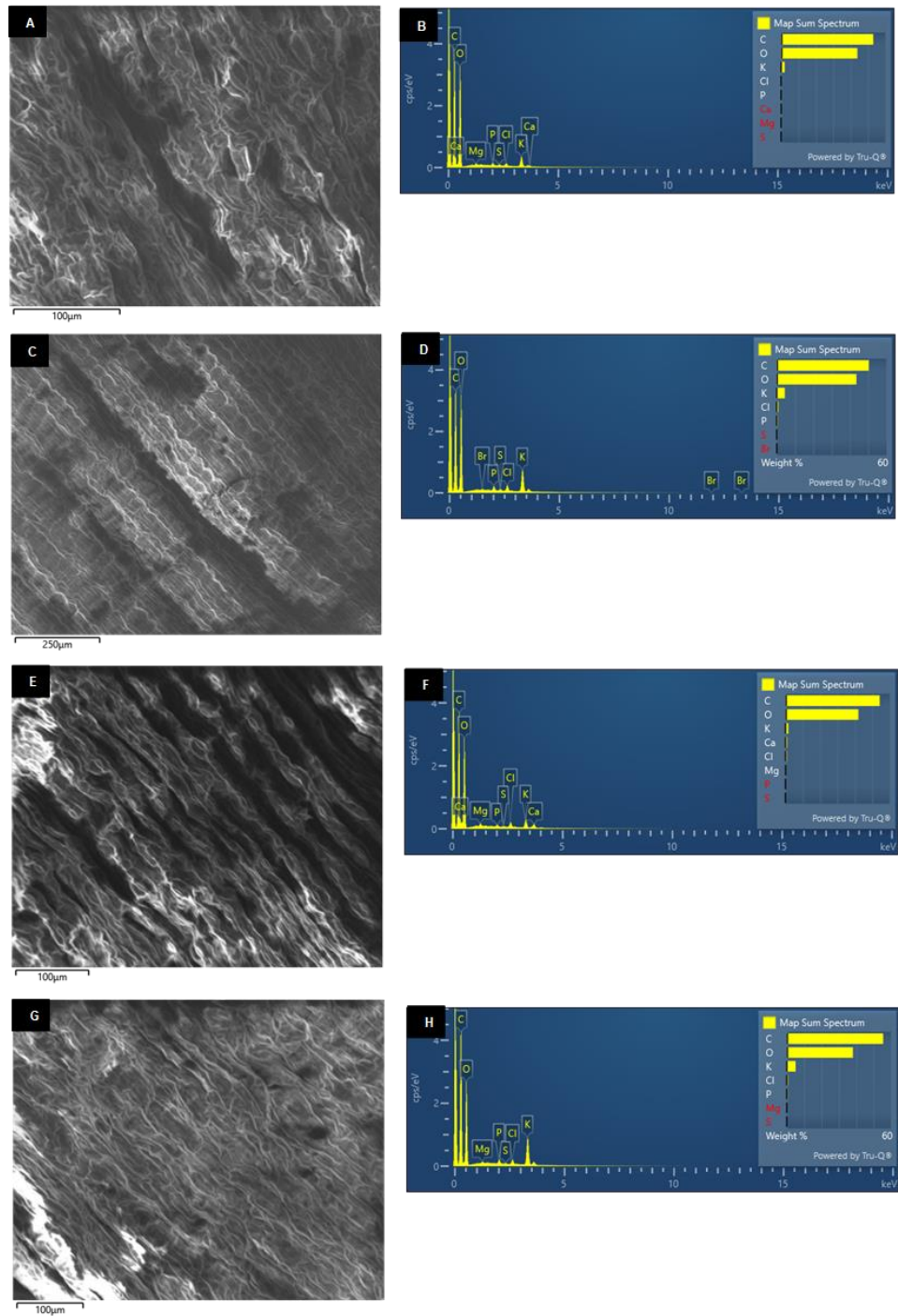


Figura 11: A, C, E y G) Micrografías de SEM para muestras de tallo y hojas sin la adición de AgNPs (blancos) y con la adición de 10 mg/ml de AgNPs, respectivamente. B, D, F, H) EDS para las muestras de tallo y hojas sin la adición de AgNPs (blancos) y con AgNPs