

Efecto de las nanopartículas de plata (NPs-Ag) en el enraizamiento *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.)

María del Carmen Hernández-León^{1*}, Rafael Gómez-Kosky¹, Edel A. Toledo-Rodríguez¹, Aydiloide Bernal-Villegas¹, Mirelis Alejo-Sierra¹, Jercy Álvarez-Ferreiro¹, Ada T. Aguiar-Fernández¹, Midiala Bermúdez-Calimano¹, Ahmed Valdés-Martínez² y Yorexis González-Alfaro²

1. Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) UEB Villa Clara (INICA-VC). Autopista Nacional, km 246, Ranchuelo. Villa Clara, Cuba

2. Centro de Estudios Avanzados de Cuba (CEA). Carretera a San Antonio de los Baños, km 1 ½. Valle Grande, La Lisa, La Habana. Cuba.

* maria.hernandez@inicavc.azcuba.cu

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar el efecto de las nanopartículas de plata (CEA, Cuba) en el enraizamiento de brotes *in vitro* de caña de azúcar, cultivar C97-445 y el control de la contaminación en el medio de cultivo. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, se estudiaron cuatro concentraciones de nanopartículas de plata 9.31; 18.63, 27.95 y 37.27 mg L⁻¹ solas y en combinación con la auxina AIA. La densidad de inóculo fue de 15 brotes *in vitro*, en frascos de cultivo plásticos, con volumen de 1 L, con 80 mL de medio de cultivo. A los 15 días de cultivo se evaluó el número total de brotes enraizados y se seleccionaron 50 de ellos por tratamiento y se les midió: altura, número de hojas, masa fresca de la planta, contenido total de clorofilas, número de raíces y longitud de la raíz más larga; además, los frascos de cultivo fueron revisados cada siete días, para así evaluar la presencia visual de microorganismos contaminantes (bacterias, hongos y levaduras), hasta su etapa final. Para las concentraciones de 9.31; 18.63 y 27.95 mg L⁻¹ NPs-Ag en combinación con la auxina AIA se alcanzó 100 % de enraizamiento excepto en la mayor concentración 37.27 mg L⁻¹, en la que se redujo este valor cerca del 20 %. Sin embargo, con la concentración de 27.95 mg L⁻¹ de NPs-Ag, sin la presencia del regulador del crecimiento, se obtuvo un 100 % de plantas con raíces. Las NPs-Ag evitaron la presencia de contaminantes microbianos del tipo bacterias en el medio de cultivo.

Palabras clave: caña de azúcar, contaminación, enraizamiento, nanopartículas, propagación *in vitro*.

ABSTRACT

The objective of the work was to determine the effect of silver nanoparticles (CEA, Cuba) on the rooting of *in vitro* shoots of sugarcane cultivar C97-445 and the control of contamination in the culture medium. A completely randomized experimental design was used studying four concentrations of silver nanoparticles 9.31; 18.63, 27.95 and 37.27 mg L⁻¹ alone and in combination with auxin AIA. The inoculum density was 15 *in vitro* shoots in 1 L volume plastic culture flasks with 80 mL of culture medium. After 15 days of cultivation, the total number of rooted shoots was evaluated and 50 of them were selected per treatment and measured: height, number of leaves, fresh mass of the plant, total content of chlorophylls, number of roots and length of shoots, the longest root. In addition, the culture flasks were checked every seven days in order to evaluate the visual presence of contaminating microorganisms (bacteria, fungi and yeasts) until their final stage. The rooting percentage, for the concentrations of 9.31; 18.63 and 27.95 mg L⁻¹ AgNPs in combination with the auxin AIA, 100 % rooting was reached except in the highest concentration 37.27 mg L⁻¹ where this value was reduced close to twenty %. However, with the concentration of 27.95 mg L⁻¹ of AgNPs without the presence of the growth regulator, 100 % of plants with roots were obtained. The AgNPs prevented the presence of bacteria-type microbial contaminants in the culture medium.

Key words: sugarcane, contamination, rooting, nanoparticles, *in vitro* propagation.

INTRODUCCIÓN

Los avances en nanotecnología que se han integrado en la biología han llevado al surgimiento de una nueva y apasionante disciplina llamada Nanobiología, indicaron Razzaq *et al.* (1). Las nanopartículas (NP: 1-100 nm de diámetro) son pequeñas formas de material de origen natural o manufacturado, cuyas propiedades difieren notablemente de las de las respectivas formas a granel del mismo material. Ciertas NP tienen usos diagnósticos y terapéuticos; algunas NP muestran una toxicidad de dosis baja, mientras que otras muestran capacidad para estimular respuestas adaptativas de dosis bajas, según Wang *et al.* (2).

La contaminación del tejido vegetal y del medio de cultivo es causada por microorganismos, en su mayoría hongos y bacterias, que crecen rápidamente en medios nutritivos. Los contaminantes microbianos en la base de los explantes y alrededor de ellos son un gran problema. Alternativamente, se ha sugerido una incorporación de antibióticos y antimicóticos en los medios de cultivo, para eliminar contaminantes microbianos, según Habida *et al.* (3); sin embargo, el uso prolongado de estos agentes puede provocar resistencia en los microorganismos. Actualmente, las nanopartículas de plata (NPs-Ag) han demostrado ser efectivas en la inhibición de agentes contaminantes (hongos, bacterias y virus), sin generar resistencia indicaron Parzymies (4).

Las NPsAg en el cultivo de tejidos vegetales son empleadas de la siguiente forma: desinfección de explantes, esterilización de medios de cultivo, inhibir efectos de etileno en algunas especies y eliminación de virus *in vitro*; no obstante, la información disponible sobre el tema es demasiado escasa para alcanzar algún consenso sobre la nanotoxicidad y su mecanismo. Los resultados demostraron que las NPsAg presentan efecto microbicida en brotes *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum spp.*), en fase de multiplicación, apuntaron Bello-Bello *et al.* (5); stevia (*Stevia rebaudiana*), vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) Spinoso-Castillo *et al.* (6) y *Psidium friedrichsthalianum* Andújar *et al.* (7). Además, se emplearon en la esterilización del medio de cultivo, para inhibir efectos de etileno. La utilización de las nanopartículas de plata tiene las siguientes ventajas: reducción de los gastos de operación, disminución de pérdidas por contaminación y saneamiento de las plantas *in vitro*.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de las nanopartículas de plata en el control de la contaminación y en el enraizamiento *in vitro* de la caña de azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Nanopartículas de Plata (NPs-Ag)

Estas fueron sintetizadas en el Centro de Estudios Avanzados (CEA), del Ministerio de Ciencia y Tecnología y Medio Ambiente, en La Habana, Cuba. Son nanopartículas de forma esférica, disueltas en agua destilada, con un diámetro hidrodinámico promedio de 63.54 nm y con una potencial zeta (mV)-39.1.

Medio de cultivo

Sales Murashige y Skoog (8) MS al 100 %, 1.0 mg L⁻¹ de tiamina, 1.3 mg L⁻¹ de AIA, 20 mg L⁻¹ de floroglucinol, 40 g L⁻¹ de sacarosa en estado líquido, según Gómez-Kosky *et al.* (9). En todos los medios de cultivo el pH se ajustó a 5.8 con NaOH (1.0 N) y HCl (1.0 N) previo a la esterilización, mediante ebullición.

Material vegetal

Se emplearon brotes *in vitro* de caña de azúcar procedentes del medio de cultivo de multiplicación con seis subcultivos. Estos tenían una longitud entre 2.0-3.0 cm y fueron colocados 5 grupos

de brotes (cada grupo formado por dos o tres brotes) en frascos de cultivo plásticos traslucidos, con medio de cultivo líquido.

Se evaluaron cuatro concentraciones de NPs-Ag 9.31; 18.63; 27.95 y 37.27 mg L⁻¹ solas y en combinación con la auxina ácido-3-indol-acético (AIA). Como control, el medio de cultivo esterilizado con Vitrofur®. Se utilizaron 30 frascos plásticos por tratamiento.

A los 15 días de cultivo se evaluaron las siguientes variables: toxicidad (porcentaje de supervivencia), contaminación por microorganismos (hongos y bacterias), número de plantas con raíces (expresado en porcentaje). Además, se realizaron evaluaciones morfofisiológicas.

Evaluaciones morfológicas

En cada experimento se seleccionaron, al azar, 50 brotes o plantas *in vitro* por tratamiento, a las que les fueron evaluadas las siguientes variables: altura (cm), desde la base del brote hasta la base de la hoja+1, número de hojas, número de raíces, longitud de la raíz más larga (cm).

Evaluación fisiológica

Contenido total de clorofilas (Unidades SPAD) equivalentes a la cantidad de clorofila y nitrógeno total determinados por métodos tradicionales, según Reeves *et al.* (10) con el empleo del detector portátil de clorofila SPAD-502 (Minolta, Japón). En todos los tratamientos la medición se realizó en primera hoja con cuello visible.

Métodos de esterilización

El medio de cultivo de enraizamiento fue desinfectado a través del método físico, mediante la ebullición a 100 °C, durante cinco minutos. Previamente los frascos de cultivo plásticos transparentes y de un volumen total de 500 mL habían sido esterilizados por el método químico, con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0.05 % (v/v). Se combinó la desinfección química de los frascos de cultivo con la posterior adición del esterilizante químico Vitrofur® (CBQ-UCLV, Cuba), a una concentración de 116.0 mg L⁻¹ se dosificaron en frascos de cultivo, a los que se les adicionó 80 mL de este.

También, los platos de aluminio para el trabajo en la cabina de flujo laminar, fueron esterilizados en la estufa a 180 °C, durante 2 h. El instrumental (pinzas y bisturíes), se desinfectó en un esterilizador eléctrico modelo DENT-EQ (Alemania), que permaneció dentro de la cámara de flujo laminar horizontal, donde se realizó el manejo del material vegetal en condiciones de esterilidad.

Una vez reducida la temperatura de este a 75 °C, se adicionaron las distintas concentraciones de nanopartículas, con el auxilio de una micropipeta (Gilson, Francia) con puntas plásticas esterilizadas en autoclave.

Condiciones de cultivo

Los frascos de cultivo con los brotes *in vitro* fueron colocados en cuartos de cultivo climatizados, a una temperatura de 27 ± 2 °C. Con luz solar, con un fotoperíodo de 13/11h de luz/oscuridad, con un rango de densidad de Flujo de fotones fotosintéticos entre 37.1 a 64.6 μmol m⁻² s⁻¹; medido con un luxómetro EXTECH Light meter 401 025 (EE.UU).

Aclimatización *ex vitro*

Las plantas *in vitro*, de los mejores tratamientos, obtenidas en el enraizamiento y el control fueron transferidas a la fase de aclimatización en condiciones de umbráculo. El área estaba cubierta con una malla sombra (Sarán), de color negro, que reduce al 50 % la intensidad luminosa. Se trasplantaron a bandejas plásticas de 60 alveolos, con capacidad cada uno para 143 cm³ de sustrato. Se utilizó como sustrato compost, a partir de cachaza de restos de la caña de azúcar, al que se le añadió zeolita, en proporción de 3:1 (v/v). El riego se realizó por aspersión, tres veces al día. Se emplearon

180 plantas *in vitro* por cada tratamiento. A los 15 días del trasplante se evaluó la supervivencia; además, también se evaluó el posible efecto fitotóxico en las plantas a los 35 días de cultivo, en estas condiciones.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con siete tratamientos y diez repeticiones. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza simple (ANOVA), previa comparación de la normalidad y homogeneidad de varianza. Las diferencias significativas entre las medias se analizaron por la prueba de Tukey, para $p \leq 0.05$. El paquete estadístico utilizado fue el SPSS, versión 23 para Windows. El experimento fue repetido dos veces.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de las NPs-Ag en el control de la contaminación y el enraizamiento *in vitro*

En el enraizamiento las NPs-Ag a las concentraciones evaluadas en el medio de cultivo de líquido estático controlaron el crecimiento de bacterias en un 100 %. Sin embargo, para el caso de los hongos ninguna concentración logro controlar la presencia y crecimiento de estos microorganismos. Las diferentes concentraciones de nanopartículas evaluadas no tuvieron un efecto tóxico que comprometiera la supervivencia de los brotes *in vitro* de caña de azúcar (tabla 1).

Respecto al porcentaje de enraizamiento, para las concentraciones de 9.31; 18.63 y 27.95 mg L⁻¹NPs-Ag en combinación con la auxina AIA se alcanzaron 100 % de enraizamiento excepto en la mayor concentración 37.27 mg L⁻¹ donde se redujo este valor cerca del 20 %. Lo cual puede demostrar un posible efecto fitotóxico con esta concentración, lo cual apoya los resultados alcanzados con igual concentración sin la auxina en el medio de cultivo. Sin embargo, con la concentración de 27.95 mg L⁻¹ de NPs-Ag sin la presencia del regulador del crecimiento se obtuvieron un 100 % de plantas con raíces.

Tabla 1. Efecto de la concentración de las nanopartículas de plata (NPs-Ag) sobre la contaminación y el enraizamiento de los brotes *in vitro* de caña de azúcar cultivar C97-445 a los 15 días de cultivo

Concentración NPs-Ag (mg L ⁻¹)	Concentración de AIA (mg L ⁻¹)	Supervivencia (%)	Contaminación hongos (%)	Enraizamiento (%)
*0 + Vitrofurul	1.3	100	0.0	98.4
9.31	1.3	100	17.5	100
9.31	0	100	12.2	42.8
18.63	1.3	100	14.5	100
18.63	0	100	11.4	93.6
27.95	1.3	100	12.8	100
27.95	0	100	13.2	100
37.27	1.3	100	12.5	81.4
37.27	0	100	10.4	83.3

Medias con letras no comunes dentro de la misma columna difieren estadísticamente según prueba de proporciones para el caso del porcentaje para $p < 0,05$ (n=60) (*Control)

Estos resultados constituyen el primer informe del efecto de NPs-Ag en el enraizamiento *in vitro* de la caña de azúcar, según la literatura científica consultada hasta el momento. Al respecto, Rezva-

ni *et al.* (11) refirieron que las NPs-Ag provocaron un crecimiento radical por el bloqueo de la señal del etileno en la especie *Crocussativus* y que el impacto en la morfología y la fisiología de las plantas dependen del tamaño y la forma de las nanopartículas.

También, Syu *et al.* (12) señalaron los efectos de tres morfologías diferentes de las NPs-Ag, incluidos los decaédricos (45 ± 5 nm), esféricos (8 ± 2 nm) y triangulares (47 ± 7 nm), sobre el crecimiento de las plántulas, la expresión génica y los cambios fisiológicos en *Arabidopsis*. El crecimiento de la raíz mejoró cuando las plántulas se trataron con NPs-Ag; ya sea triangulares o decaédricas, pero no se detectó crecimiento después del tratamiento esférico de NPs-Ag. Además, informaron que el tratamiento con este tipo de nanopartículas altera el contenido de enzimas antioxidantes y la expresión de genes que están involucrados en la biosíntesis de auxina, ácido abscísico y etileno. Iguales resultados señalaron Manh *et al.* (13) en la propagación *in vitro* de *Panaxvietnamensis*.

En relación con lo anterior, Gruyer *et al.* (14) informaron que estas pudieron tener un efecto positivo y negativo en la elongación de la raíz dependiendo de la especie de planta. También, Salama (15) refirió al efecto de estas nanopartículas en una concentración de 60 mg L^{-1} en la estimulación de la elongación de las raíces en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y maíz (*Zea mays* L.).

Por su parte Sarmast *et al.* (16) plantearon que estas nanopartículas tuvieron un efecto positivo en la estimulación del crecimiento de las raíces *in vitro* de la especie *Tecomellaundulata*, igual que Nhat Linh *et al.* (17) en ginseng (*Panaxvietnamensis* Ha etGrushv.). Al respecto Muthuramalingam *et al.* (18) señalaron resultados semejantes mediante la utilización de las NPs-Ag en combinación con el AIA y con el AIB en comparación con el empleo de estos reguladores del crecimiento solos en el medio de cultivo. Los resultados del presente trabajo apoyan los alcanzados por estos autores.

Para las variables altura, número de raíces y longitud de la raíz más larga la concentración de 27.95 mg L^{-1} de NPs-Ag con la presencia o no del AIA superaron al resto de los tratamientos y el control con diferencias significativas (figura 1 A, B). No obstante, para el número de hojas no se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos y el control. Se destaca por las diferentes concentraciones de nanopartículas el incremento en el contenido de clorofilas totales (unidades SPAD) en las plantas *in vitro* con diferencias significativas respecto al control (tabla 2).

Tabla 2. Efecto de las concentraciones de las nanopartículas de plata (NPs-Ag) sobre la morfo-fisiología de las plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cultivar C97-445) a los 15 días de cultivo en medio de cultivo de enraizamiento

Concentración NPs-Ag (mg L^{-1})	Concentración de AIA (mg L^{-1})	Altura (cm)	No de hojas	No. de raíces	Longitud raíz más larga (cm)	Clorofilas totales (unidades SPAD)
*0 + Vitrofurcal	1.3	4.16 c	5.2 a	2.66 b	1.53 b	13.42 b
9.31	1.3	4.35 b	5.0 a	2.98 b	1.24 b	24.45 a
9.32	0	4.21 bc	4.6 a	2.16 b	1.18 b	23.41 a
18.63	1.3	4.46 b	4.5 a	3.13 b	1.09 b	23.73 a
18.63	0	4.48 b	4.7 a	3.00 b	1.46 b	23.52 a
27.95	1.3	5.33 a	5.3 a	9.53 a	2.96 a	24.67 a
27.95	0	5.40 a	5.1 a	10.60 a	3.45 a	25.83 a
37.27	1.3	4.15 c	4.8 a	2.84 b	0.88 b	22.67 a
37.27	0	4.56 b	5.9 a	2.66 b	0.72 b	26.26 a
MG±EE		4.40±0.15	4.38±0.22	4.91±0.33	1.44±0.12	22.58±0.94

Medias con letras no comunes dentro de la misma columna difieren estadísticamente según prueba de Tukey para $p < 0,05$ ($n=60$) (*Control) MG±EE: Media General ± Error Estándar.

En estudios realizados por Tymoszek y Miler (19) con la adición al medio de cultivo de NPs-Ag en combinación con el AIA. Estos autores informaron que en las especies *Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitam cv 'Bydgoszezanka' y *Gerbera x jamesonii* cv. 'Suri' las nanopartículas de plata a las concentraciones de 10 y 30 mg L⁻¹ estimularon la longitud de la raíz, no así para el número, ni el diámetro de estas. También, Muthuramalingam *et al.* (18) señalaron que los brotes *in vitro* de tabaco (*Nicotianatabacum* L.) tratados con "nanobalas" (nanopartículas de plata con las auxinas AIA y ácido indol-butírico AIB) estimularon un mayor número de raíces, con una mayor longitud y número de pelos absorbentes.

Aclimatización ex vitro

A los 15 días después del trasplante, las plantas *in vitro* de caña de azúcar, de los mejores tratamientos en el enraizamiento (27.95 mg L⁻¹ NPs-Ag, con AIA y sin ella) alcanzaron valores de supervivencia iguales al control (92.8; 93.3 y 91.6 %, respectivamente), en condiciones de umbráculo. Esto demostró una vez más el efecto no tóxico de las NPs-Ag a la concentración empleada durante la fase de aclimatización a los 35 días de cultivo (figura 1C).

CONCLUSIONES

Las concentraciones de NPs-Ag utilizadas en el enraizamiento permiten un control del 100 % de la contaminación por bacterias, no así para los hongos.

Se logra, con la concentración de 27.95 mg L⁻¹ de NPs-Ag, un efecto positivo en el enraizamiento de los brotes *in vitro* de caña de azúcar, con presencia de la auxina o sin ella.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Razzaq, A., R. Ammara, H.M. Jhazab, T. Mahmood, A. Hafeez, S. Hussain. A novel nanomaterial to enhance growth and yield of wheat. *Journal NanoscienceTechnology*.2 (1):55-58, 2015.
2. Wang, P., E. Lombi, Z. Fang-Jie, P.M. Kopittke. Nanotechnology: A new opportunity in plant sciences. *Trends in Plant Science* 21 (8): 699-712, 2016.

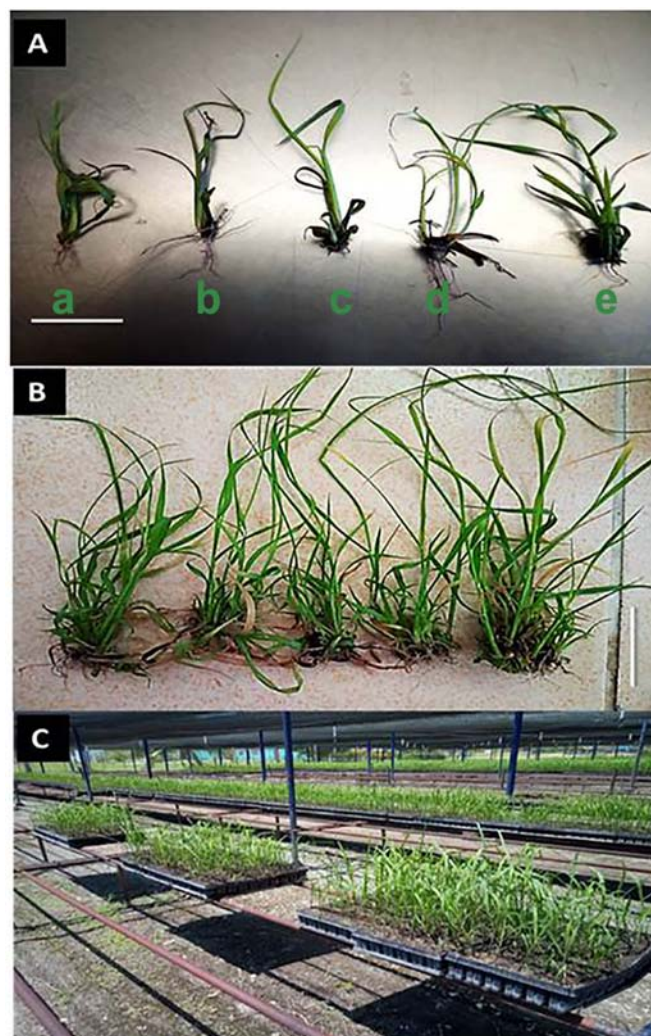


Figura 1. Efecto de las NPs-Ag en el enraizamiento *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. C97-455), a los 15 días de cultivo.

(A)(a) Control, (b) NPs-Ag 18.65 mg L⁻¹+AIA, (c) NPs-Ag 18.65 mg L⁻¹, (d) NPs-Ag 27.95 mg L⁻¹+AIA, (e) NPs-Ag 27.95 mg L⁻¹. (B) Grupos de plantas *in vitro* enraizadas en el tratamiento NPs-Ag 27.95 mg L⁻¹. (C) Plantas *in vitro* en fase de aclimatización *ex vitro* de los tratamientos con NPs-Ag 27.95 mg L⁻¹+AIA, NPs-Ag 27.95 mg L⁻¹ y el control, a los 35 días después del trasplante.

3. Habida, U., S. Reja, M.L. Saha, M.R. Khan. Endogenous bacterial contamination during in vitro culture of table banana: identification and prevention. *Plant Tissue and Organ Culture* 12 (2):117-124, 2002.
4. Parzymies, M. Nano-Silver particles reduce contaminations in tissue culture but decrease regeneration rate and slows down growth and development of *Aldrovandavesiculosa* explants. *Applied Sciences* 11: 36-53, 2021. <https://doi.org/10.3390/app11083653>
5. Bello-Bello, J.J., R.A. Chavez-Santoscoy, C.A. Lecona-Guzmán, N. Bogdanchikova, J. Salinas-Ruiz, F.C. Gómez-Merino, A. Pestryakov. Hormetic Response by Silver Nanoparticles on In Vitro Multiplication of Sugarcane (*Saccharum* spp. cv. Mex 69-290) Using a Temporary Immersion System. *Dose Response* 15(4):1-9, 2017.
6. Spinoso-Castillo, J.L., R.A. Chavez-Santoscoy, N.J.A. Bogdanchikova, V. Pérez-Sato, J. Morales-Ramos, J. Bello-Bello. 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 Organ Culture* 129:195–207, 2017.
7. Andújar I., González N., Juan Carlos García J.C., Nina Bogdanchikova N., Pestryakov A. Argovit™ silver nanoparticles reduce contamination levels and improve morphological growth in the *in vitro* culture of *Psidiumfriedrichsthalianum* (O. Berg) Nied. *SN Applied Sciences*. 2(2110): 1-9, 2020.
8. Murashige, T., and F. Skoog. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15:473-497, 1962.
9. Gómez-Kosky, R., P.A Machado, M.C. Bermúdez, A.V. Bernal, Y. Otero, D.J. Núñez, J.F. Álvarez, D.D. Daniels, L. P. Posada. Effect of Phloroglucinol on in vitro rooting of sugarcane (*Saccharum* spp. cv C90-469). *Sugar Tech*. 23 (3): 466-471, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12355-020-00906-y>
10. Reeves, W.D., P.L. Mask, C.W. Wood, D.P. Delay. Determination of wheat nitrogen status with a handheld chlorophyll meter. Influence of management practices. *Journal of Plant Nutrition*. 16: 7781-7796, 1993.
11. Rezvani, N., A. Sorooshzadeh, N. Farhadi. Effect of nano-silver on growth of saffron in flooding stress. *World Academic Science Engineer Technology* 1:517–522, 2012.
12. Syu, Y.Y., J.H. Hung, J.C. Chen, H.W. Chuang. Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry* 83:57–64, 2014.
13. Manh Cuong, D., Cong Du, P., Tung, H.T. *et al.* Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panaxvietnamensis* a valuable medicinal plant. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02095-2>
14. Gruyer, N., M. Dorais, C. Bastien, N. Dassylva, G. Triffault-Bouchet. Interaction between silver nanoparticles and plant growth. En: *Proceeding of International symposium on new technologies for environment control, energy-saving and crop production in greenhouse and plant factory—greensys*, Corea, 6–11 Oct 2013. *Acta Horticulturae* 1037: 795-800, 2014.
15. Salama, M.H. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *International Research Journal of Biotechnology* 3(10): 190-197, 2012.
16. Sarmast, M.K., A. Niazi, H. Salehi, A. Abolmoghadam. Silver nanoparticles affect ACS expression in *Tecomellaundulata* in vitro culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 121(1): 227–236, 2014.
17. Nhat Linh, NT., H. Thanh Tung, V. ThiHien, V. Quoc Luan, N. PhucHuy, N. Hoang Loc, D. Tan Nhut. Effect of metal nanoparticles on the growth of Ngoc Linh ginseng (*Panaxvietnamensis*

- Ha et Grushv.) lateral roots culture *in vitro* 126. 1: 47-56, 2017. <https://doi.org/10.26459/hue-uni-jns.v126i1C.4524>
18. Muthuramalingam TR., Gunasekaran D., Immanuel M., Riyaz M., Sundarajan D., Krishnan K. Nanobiotechnology approach using plant rooting hormone synthesized silver nanoparticle as “nanobullets” for the dynamic applications in horticulture - An *in vitro* and *ex vitro* study. Arabian Journal of Chemistry. 11: 48-61, 2018.
19. Tymoszuik, A., and N. Miler. Silver and gold nanoparticles impact on *in vitro* adventitious organogenesis in chrysanthemum, gerbera and Cape Primrose. Scientia Horticulturae. 257: 108-114, 2019.