

SILVER NANOPARTICLES AFFECT THE MICROPROPAGATION OF VANILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews)

LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA AFECTAN LA MICROPROPAGACIÓN DE VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews)

Miriam C. Pastelín-Solano¹, Marco A. Ramírez-Mosqueda², Nina Bogdanchikova³,
Celia G. Castro-González², Jericó J. Bello-Bello^{4*}

¹Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Carretera Peñuela-Amatlán de los Reyes Km 1, 94950, Veracruz, México. ²Campus Córdoba, Colegio de Postgraduados. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Congregación Manuel León, Municipio Amatlán de los Reyes. 94946, Veracruz, México. ³Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Carretera Tijuana-Ensenada Km 107, Ensenada. 22800, Baja California, México. ⁴CONACYT-Campus Córdoba, Colegio de Postgraduados. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Congregación Manuel León, Municipio Amatlán de los Reyes. 94946, Veracruz, México. (jericobello@gmail.com).

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) have various applications in plant biotechnology, mainly to eradicate microbial contamination and promote *in vitro* development. The aim of this study was to evaluate the effects of silver nanoparticles during micropropagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) in a semi-solid medium. The morphology of nanoparticles was examined with a transmission electron microscope (TEM). For *in vitro* establishment, nodal segments of 2 cm in length were cultured on Murashige and Skoog (MS) semi-solid medium supplemented with 2 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP). AgNPs concentrations of 0, 25, 50, and 100 mg L⁻¹ and 5, 10, and 20 min exposure times were evaluated during *in vitro* establishment. For multiplication, shoots of 2 cm in length were transferred to the same medium containing 0, 25, 50, and 100 mg L⁻¹ concentrations of AgNPs. The characterization of AgNPs revealed a spherical shape with a form factor of 0.82, a roundness of 0.88, and average diameters of 35 ± 15 nm. During *in vitro* establishment, the lowest total percent contamination (23.3, 21.6, and 16.6%) corresponded to explants exposed to 100 mg L⁻¹ of silver nanoparticles for 5, 10, and 20 min, respectively. For shoot multiplication, the greatest lengths, number of shoots, and number of leaves were obtained from 25 mg L⁻¹ and 50 mg L⁻¹ of AgNPs. Treatments with AgNPs had no effect on shoot rooting or plantlet survival during acclimatization. These results suggest that the use of AgNPs can be an effective alternative for the reduction of contamination during

RESUMEN

Las nanopartículas de plata (AgNP) tienen varias aplicaciones en la biotecnología de plantas, y principalmente para erradicar la contaminación microbiana y promover el desarrollo *in vitro*. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de las nanopartículas de plata durante la micropropagación de la vainilla (*Vanilla planifolia*) en un medio semisólido. La morfología de las nanopartículas se examinó con un microscopio de transmisión de electrones (TEM). Para el establecimiento *in vitro*, segmentos nodales de 2 cm de longitud se cultivaron en el medio semisólido de Murashige y Skoog (MS) más un suplemento con 2 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP). Durante el establecimiento *in vitro* se evaluaron 0, 25, 50 y 100 mg L⁻¹ concentraciones de AgNP y tiempos de exposición de 5, 10 y 20 min. Para la multiplicación, se transfirieron vástagos de 2 cm de longitud al mismo medio, pero con 0, 25, 50 y 100 mg L⁻¹ concentraciones de AgNP. La caracterización de las AgNP reveló una forma esférica con un factor de forma de 0.82, una redondez de 0.88 y un diámetro promedio de 35 ± 15 nm. Durante el establecimiento *in vitro*, el porcentaje de contaminación total más bajo (23.3, 21.6 y 16.6%) correspondió a los explantes expuestos a 100 mg L⁻¹ de nanopartículas de plata durante 5, 10 y 20 min, respectivamente. Para la multiplicación del vástago, la longitud, el número de vástagos y el número de hojas más altos se obtuvieron con 25 mg L⁻¹ y 50 mg L⁻¹ de AgNP. El tratamiento con AgNP no tuvo efecto en el enraizamiento del vástago o en la supervivencia de la plántula durante la aclimatización. Estos resultados sugieren que el uso de AgNP puede ser una alternativa eficaz para reducir la contaminación durante el establecimiento *in vitro* y promover el desarrollo durante la micropropagación de *V. planifolia*.

* Author for correspondence ❖ Autor responsable.

Received: March, 2019. Approved: June, 2019.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 1-13. 2020.

in vitro establishment and the promotion of development during micropropagation of *V. planifolia*.

Keywords: Nanobiotechnology, *in vitro* culture, micropropagation, organogenesis, *Vanilla planifolia*.

INTRODUCTION

Advances in nanotechnology integrated into biology have led to the emergence of nanobiotechnology (Razzaq *et al.*, 2015; Jampílek and Králová 2018). Nanoparticles (1-100 nm in diameter) are small grains made of natural or manufactured source material whose properties differ markedly from those of the respective bulk forms of the “same” material (Buzea *et al.*, 2007; Ju-Nam and Lead, 2008; Calabrese, 2016a). Currently, silver nanoparticles (AgNPs) have numerous medical and industrial applications due to their antimicrobial properties (Mahna *et al.*, 2013; Mishra and Singh, 2015). In plant tissue cultures, AgNPs were used to reduce contamination in *Valeriana officinalis* (Abdi *et al.*, 2008), *Araucaria excelsa* var. *Glauca* (Sarmast *et al.*, 2011), *Prunus amygdalus* × *Prunus persica* (Arab *et al.*, 2014), and *Dianthus caryophyllus* (Ahmadian *et al.*, 2015). In addition to their antibacterial properties, AgNPs have a strong influence on plant growth and development (Ma *et al.*, 2010). This effect, characterized by low-dose stimulation and high-dose inhibition, is called hormesis (Calabrese, 2008). Besides, some aluminum, titanium dioxide and silver nanoparticles can initiate hormesis in plants (Stovbun *et al.*, 2012; Calabrese, 2016b; Bello-Bello *et al.*, 2017).

Argovit is a commercial formulation of AgNPs and possesses broad-spectrum antimicrobial activity (Vazquez-Muñoz *et al.*, 2014). This product is approved in Russia and other countries for use in veterinary and human applications, *i.e.*, cosmetics, hemostatic sponges for surgery, and nutritional supplements (Borrego *et al.*, 2016). However, there are few studies about the growth-stimulation and microbicide effect of AgNPs in plant biotechnology through *in vitro* cultures.

Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) is one of the most important spice crops worldwide. Vanilla extract for food use is obtained from the pods (Gantait and Kundu, 2017). The propagation of vanilla by tissue culture has advantages over conventional

Palabras clave: bionanotecnología, cultivo *in vitro*, micropropagación, organogénesis, *Vanilla planifolia*.

INTRODUCCIÓN

Los avances en nanotecnología integrados a la biología han dado lugar a la bionanotecnología (Razzaq *et al.*, 2015; Jampílek y Králová 2018). Las nanopartículas (1-100 nm de diámetro) son pequeños granulos formados de material de origen natural o sintético, cuyas propiedades difieren notablemente de las de sus respectivas formas a granel (Buzea *et al.*, 2007; Ju-Nam y Lead, 2008; Calabrese, 2016a). Ahora, las nanopartículas de plata (AgNP) tienen numerosas aplicaciones en la medicina y la industria debido a sus propiedades antimicrobianas (Mahna *et al.*, 2013; Mishra y Singh, 2015). En cultivos de tejido vegetal, las AgNP se usaron para disminuir la contaminación en *Valeriana officinalis* (Abdi *et al.*, 2008), *Araucaria excelsa* var. *Glauca* (Sarmast *et al.*, 2011), *Prunus amygdalus* × *Prunus persica* (Arab *et al.*, 2014) y *Dianthus caryophyllus* (Ahmadian *et al.*, 2015). Además de sus propiedades antimicrobianas, las AgNP tienen gran influencia en el crecimiento y desarrollo de plantas (Ma *et al.*, 2010). Este efecto, caracterizado por la estimulación por dosis bajas e inhibición por dosis elevadas, se llama hormesis (Calabrese, 2008). Y algunas nanopartículas de aluminio, dióxido de titanio y plata pueden iniciar la hormesis en plantas (Stovbun *et al.*, 2012; Calabrese, 2016b; Bello-Bello *et al.*, 2017).

Argovit es una formulación comercial de AgNP con un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Vazquez-Muñoz *et al.*, 2014). Este producto está aprobado en Rusia y otros países para uso veterinario y aplicaciones humanas (por ejemplo, cosméticos, esponjas hemostáticas para cirugía y suplementos nutricionales) (Borrego *et al.*, 2016). Sin embargo, hay pocos estudios sobre el efecto de estimulación del crecimiento y el efecto antimicrobiano de las AgNP en la biotecnología de plantas a través de cultivos *in vitro*.

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) es uno de los cultivos de condimento más importantes en el mundo. El extracto de vainilla usado en alimentos se obtiene de las vainas (Gantait y Kundu, 2017). La propagación de la vainilla mediante el cultivo de tejidos tiene ventajas sobre los métodos convencionales (Zuraida *et al.*, 2013; Ramírez-

methods (Zuraida *et al.*, 2013; Ramírez-Mosqueda and Iglesias-Andreu, 2016; Gantait and Kundu 2017; Spinoso-Castillo *et al.*, 2017). However, AgNPs have a stimulating effect in the micropropagation of vanilla cultivated in temporary immersion systems (Spinoso-Castillo *et al.*, 2017), but high doses of AgNPs decreased *in vitro* development and increased synthesis of reactive oxygen species (ROS). Therefore, the doses of AgNPs should be adapted for each *in vitro* culture system in order to improve micropropagation. The aim of this study was to evaluate the effects of silver nanoparticles during micropropagation of vanilla in a semi-solid medium. The hypothesis was that the use of AgNPs reduces contamination during *in vitro* establishment and promotes shoot proliferation of vanilla.

MATERIALS AND METHODS

Morphology and characterization of nanoparticles

AgNPs used in this study were obtained from Scientific-Production Centre Vector-Vita Ltd, Novosibirsk, Russia, and the product is marketed as "Argovit". The morphology of nanoparticles (Argovit) was examined under an electronic transmission microscope (Morgagni M-268, Philips/FEI, The Netherlands). For the morphology analysis, 5 μL of particles in suspension were mounted on a copper grid of Formvar 300 mesh/carbon (Electron Microscopy Science, PA, USA). Samples were dried 5 min at room temperature. The operating conditions in all experiments were 80 kV, 1000-140000X, 5×10^{-3} Pa (5×10^{-5} Torr). Micrographs were captured in TIFF format (1376 \times 1032 pixels) in grayscale, 0 was assigned to black and 255 to white. The original stock solution (20% Argovit) used in these experiments corresponds to 1.2% (wt) metallic silver.

Effect of silver nanoparticles on *in vitro* establishment of vanilla

Stems measuring 40-50 cm in length were cut from 6-month-old vanilla cuttings in a greenhouse. Leaves were removed and nodal segments of 2 cm in length were cut off for use as explants. These were washed with tap water and commercial soap for 1 h. Explants were transferred to a laminar flow hood (Ecoshel[®] CO, USA) and immersed in 0.2% (w/v) 50PH Captan[®] (N-trichloromethylthio-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide) for 30 min, followed by 70% ethanol (v/v) for 1 min and three rinses with sterile distilled water.

Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2016; Gantait y Kundu 2017; Spinoso-Castillo *et al.*, 2017). Sin embargo, las AgNP tienen un efecto estimulante en la micropropagación de la vainilla cultivada en sistemas de inmersión temporales (Spinoso-Castillo *et al.*, 2017), pero dosis elevadas de AgNP disminuyen el desarrollo *in vitro* y aumentan la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por lo tanto, las dosis de AgNP se deben adaptar para cada sistema de cultivo *in vitro*, para mejorar la micropropagación. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de las nanopartículas de plata durante la micropropagación de la vainilla en un medio semisólido. La hipótesis fue que el uso de las AgNP disminuye la contaminación durante el establecimiento *in vitro* y promueve la proliferación del vástago de la vainilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Morfología y caracterización de las nanopartículas

Las AgNP usadas en este estudio se obtuvieron del Centro de Producción Científica Vector-Vita Ltd, Novosibirsk, Rusia y el producto se comercializa como "Argovit". La morfología de las nanopartículas (Argovit) se examinó con un microscopio electrónico de transmisión (Morgagni M-268, Philips/FEI, Países Bajos). Para el análisis morfológico, 5 mL de partículas se montaron en suspensión en una rejilla de cobre con malla 300 recubierta con Formvar/carbón (Electron Microscopy Science, PA, EUA). Las muestras se secaron 5 min a temperatura ambiente. Las condiciones de operación fueron 80 kV, y 1000-140000X, 5×10^{-3} Pa (5×10^{-5} Torr). Las micrografías se capturaron en formato TIFF (1376 \times 1032 píxeles) y en escala de grises, se asignó 0 al color negro y 255 al blanco. La solución patrón original (Argovit al 20%) usada en estos experimentos corresponde a 1.2% (peso) de plata metálica.

Efecto de las nanopartículas de plata en el establecimiento *in vitro* de la vainilla

Tallos de 40-50 cm de longitud se cortaron de esquejes de vainilla de 6 meses de edad mantenidos en invernadero. Las hojas se retiraron y segmentos nodales de 2 cm de longitud se cortaron para su uso como explantes, que se lavaron con agua del grifo y jabón comercial por 1 h. Los explantes se transfirieron a una campana de flujo laminar (Ecoshel[®] CO, EUA) y se sumergieron en Captan[®] 50PH (N-triclorometiltio-4-ciclohexano-1,2-dicarboximida) al 0.2% (w/v) por 30 min, seguido de etanol al 70% (v/v) por 1 min y tres enjuagues con agua destilada estéril.

After surface disinfection, explants were immersed in four concentrations of AgNPs (0, 25, 50, and 100 mg L⁻¹) for three immersion times (5, 10, and 20 min). AgNPs-free sterile distilled water was used as a control treatment, using the same immersion times.

Explants were cultured in 2.2×15 cm test tubes with 15 mL MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose and 2 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP, Sigma Chemical Company, MO, USA). Phytigel (Sigma Chemical Company, MO, USA), 2.2 g L⁻¹, was added as a gelling agent. The pH of the culture medium was adjusted to 5.8 (with 0.1 N sodium hydroxide or 0.1 N hydrochloric acid) and autoclaved for 15 min at 120 °C. Explants were incubated at 24±2 °C, 16 h light photoperiod and irradiance 30-40 μmol m⁻² s⁻¹ provided by fluorescent lamps. After 45 d, percent contamination, shoot length, and number of leaves were recorded for each treatment. Total contamination and bacterial and fungal contamination was occasionally recorded in the same explant. Fungi and bacteria developed in *in vitro* cultures were isolated and identified by the Phytosanitary Integrated Diagnostic Laboratory (Laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario, LADIFIT) at Colegio de Postgraduados Campus Montecillo (Accreditation No. SA-0642-017/15).

Effect of silver nanoparticles on shoot multiplication of vanilla

Vanilla shoots (2 cm in length, containing a nodal segment with a bud) were used as explants and transferred to 500 mL culture recipients, to which 30 mL of MS medium supplemented with 2 mg L⁻¹ BAP (Sigma Chemical Company, MO, USA), 0, 25, 50, 100, and 200 mg L⁻¹ of AgNPs were added. Culture conditions were as described above. After 60 d of culture, total percent contamination, number of shoots per explant, shoot length, and number of leaves were recorded for each treatment.

Rooting and acclimatization

Individual shoots (4-5 cm in height) were subcultured in rooting medium (half-strength MS medium), supplemented with 20 g L⁻¹ sucrose without AgNPs or growth regulators. Culture time was 30 d. Complete plantlets including a developed root system were obtained by *in vitro* culture. These were washed gently with tap water to remove medium attached to the roots. Plantlets with well-developed roots were washed thoroughly in running tap water to remove residual medium and dipped in 0.2% (v/v) Captan[®] for 1 min before being transferred to agrolite/peatmoss (1:2) in plastic trays. Plants were grown in the greenhouse for acclimatization and kept at 30 °C and 95±2% relative humidity.

Después de la desinfección superficial, los explantes se sumergieron en cuatro concentraciones de AgNP (0, 25, 50 y 100 mg L⁻¹) por tres tiempos de inmersión (5, 10 y 20 min). Agua destilada estéril libre de AgNP se usó como tratamiento testigo, y con los mismos tiempos de inmersión.

Los explantes se cultivaron en tubos de ensayo de 2.2×15 cm con 15 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y suplemento con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 2 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP, Sigma Chemical Company, MO, EUA). Phytigel (Sigma Chemical Company, MO, EUA), 2.2 g L⁻¹ se adicionó como un agente gelificante. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 (con hidróxido de sodio 0.1 N o ácido clorhídrico 0.1 N) y se esterilizó 15 min en autoclave a 120 °C. Los explantes se incubaron a 24±2 °C, con un fotoperiodo de 16 h de luz e irradiación de 30-40 μmol m⁻² s⁻¹ proporcionada por lámparas fluorescentes. Después de 45 d, para cada tratamiento se registró el porcentaje de contaminación, la longitud del vástago y el número de hojas. La contaminación total y la contaminación por bacterias y hongos se registró ocasionalmente en el mismo explante. El Laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario (LADIFIT) del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo (Núm. de acreditación SA-0642-017/15) aisló e identificó los hongos y bacterias que crecieron en los cultivos *in vitro*.

Efecto de las nanopartículas de plata en la multiplicación de vástagos de vainilla

Los vástagos de vainilla (segmentos nodales de 2 cm de longitud con una yema) se utilizaron como explantes y se transfirieron a recipientes para cultivo de 500 mL, a los cuales se agregaron 30 mL de medio MS con suplemento de 2 mg L⁻¹ de BAP (Sigma Chemical Company, MO, EUA) y 0, 25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹ de AgNP. Las condiciones de cultivo se describieron en el apartado anterior. Después de 60 d de cultivo, el porcentaje total de contaminación, el número de vástagos por explante, la longitud del vástago y el número de hojas se registró para cada tratamiento.

Enraizamiento y aclimatación

Los vástagos individuales (4-5 cm de altura) se subcultivaron en medio de enraizamiento (concentración media del medio MS), más suplemento con 20 g L⁻¹ de sacarosa sin AgNP o reguladores de crecimiento. El tiempo de cultivo fue 30 d. Plántulas completas con un sistema radical desarrollado se obtuvieron mediante cultivo *in vitro*. Estas plántulas se lavaron suavemente con agua de grifo para retirar el medio adherido a las raíces. Las plántulas con raíces bien desarrolladas se lavaron muy bien con agua de grifo para retirar los restos de medio, y se sumergieron 1 min en Captan[®] al 0.2% (v/v) antes de transferirlas a bandejas de plástico con agrolita/mus-

Plants were watered with tap water every 2 d. For each treatment, 38 vitroplantlets were acclimatized using trays with 38 cavities.

Experimental design and data analysis

All experiments were conducted using a completely randomized design. For *in vitro* establishment, 30 explants were used in each treatment. A factorial analysis with two levels (time and AgNPs concentration) was carried out. For shoot multiplication, 15 explants per treatment were used for each treatment. All experiments were conducted in triplicate and analyzed with ANOVA. A Tukey test ($p \leq 0.05$) was performed with SPSS (version 22 for Windows). Percent data were arcsine-transformed prior to the statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphology and characterization of nanoparticles

The physicochemical characteristics of AgNPs are presented in Table 1. The AgNPs characterized by TEM shows a spherical shape with a form factor of 0.82 and a roundness of 0.88. AgNPs consists of spherical silver nanoparticles with an average diameter of 35 ± 15 nm (Figure 1), made of clustered silver (12 mg mL^{-1} metallic silver) functionalized with 188 mg mL^{-1} of polyvinylpyrrolidone (PVP, 10-30 kD).

Effect of silver nanoparticles on *in vitro* establishment

Significant differences were observed among AgNPs treatments evaluated during *in vitro* establishment (Table 2). However, the factorial analysis showed no interaction between AgNPs concentrations and immersion times. The identified contaminants were the bacterium *Pseudomonas psychrotolerans* and the

go de turba (1:2). Las plantas crecieron en el invernadero para su aclimatación a 30°C y humedad relativa de $95 \pm 2\%$. Las plantas se regaron con agua de grifo cada 2 d. Para cada tratamiento 38 plántulas *in vitro* se aclimataron en bandejas con 38 cavidades.

Diseño experimental y análisis de datos

Todos los experimentos se realizaron con un diseño completamente aleatorizado. Para el establecimiento *in vitro*, se usaron 30 explantes en cada tratamiento. Un análisis factorial se realizó con dos niveles (tiempo y concentración de AgNP). Para la multiplicación de los vástagos se usaron 15 explantes por tratamiento. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y analizados con ANDEVA. Una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se realizó con SPSS (versión 22 para Windows). Los datos porcentuales se transformaron por arcoseno antes del análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología y caracterización de las nanopartículas

Las características fisicoquímicas de las AgNP se presentan en el Cuadro 1. Las AgNP caracterizadas por TEM muestran una forma esférica con un factor de forma de 0.82 y una redondez de 0.88. Las AgNP son nanopartículas esféricas de plata con un diámetro promedio de 35 ± 15 nm (Figura 1), formadas por agregados de plata (12 mg mL^{-1} de plata metálica) funcionalizadas con 188 mg mL^{-1} de polivinilpirrolidona (PVP, 10-30 kD).

Efecto de las nanopartículas de plata en el establecimiento *in vitro*

Diferencias significativas se observaron entre los tratamientos con AgNP evaluados durante el establecimiento *in vitro* (Cuadro 2). Sin embargo, el análisis factorial no mostró interacción entre las

Table 1. Physicochemical properties of Argovit.
Cuadro 1. Características fisicoquímicas de Argovit.

Properties	Mean
Metallic silver content (% wt)	1.2
PVP Content (% wt)	18.8
Form Factor (Spheroid)	0.82
Average diameter of metallic silver particles by TEM (nm)	38 ± 15
Roundness	0.88
Size interval of metallic silver particles by TEM (nm)	1 to 80

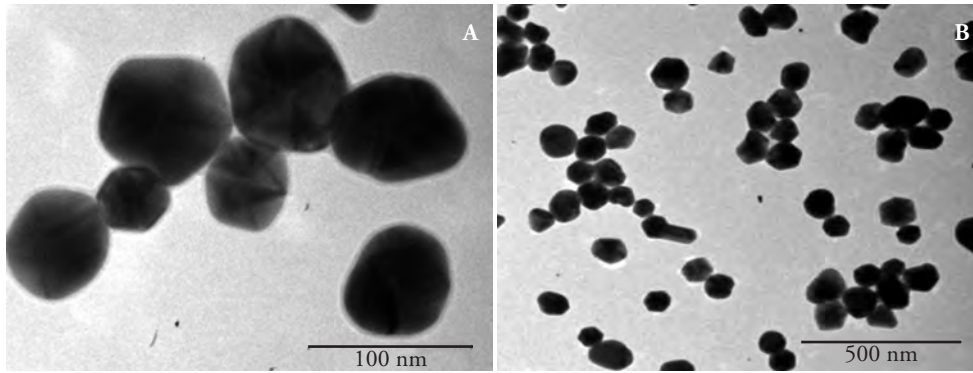


Figure 1. Microphotographs of Argovit AgNPs. A) TEM micrograph of AgNPs aggregates with spherical morphology and different sizes in a 36.59-66.24 nm range; bar=100 nm; B) TEM micrograph of AgNPs aggregates, bar=500 nm.

Figura 1. Microfotografías de AgNP de Argovit. A) micrografía de TEM de agregados de AgNP con morfología esférica y tamaños diferentes en un intervalo de 36.59-66.24 nm; barra=100 nm; B) micrografía de TEM de agregados de AgNP, barra=500 nm.

Table 2. Effect of exposure time and concentration of silver nanoparticles on *in vitro* establishment of vanilla (*Vanilla planifolia*) after three weeks of culture.

Cuadro 2. Efecto del tiempo de exposición y la concentración de nanopartículas de plata en el establecimiento *in vitro* de la vainilla (*Vanilla planifolia*) después de tres semanas de cultivo.

Time (min)	AgNPs concentration (mg L ⁻¹)	Fungal contamination (%)	Bacterial contamination (%)	Total contamination (%)	Shoot length (cm)	Number of leaves
5	0	41.6±6.0 ab	31.0±1.0 ab	57.5±3.8 ab	2.3±0.1 bc	1.8±0.4 c
	25	33.3±1.6 ab	13.3±1.6 b	46.6±1.6 abc	3.2±0.2 ab	2.5±0.2 ab
	50	32.5±2.5 ab	10.8±0.8 b	40.0±5.7 bcd	3.2±0.2 ab	2.5±0.2 ab
	100	23.3±1.6 bc	10.8±0.8 b	23.3±1.6 de	4.1±0.2 a	4.0±0.4 a
10	0	51.6±1.6 a	36.6±6.6 a	55.0±2.8 abc	2.3±0.1 bc	2.2±0.2 bc
	25	31.6±1.6 ab	15.0±2.8 b	43.3±4.4 bc	3.6±0.2 ab	3.6±0.2 ab
	50	25.0±8.6 bc	15.0±5.0 b	38.3±3.3 bcd	3.2±0.2 ab	3.4±0.2 ab
	100	18.3±4.4 bc	10.0±5.0 b	21.6±1.6 de	4.2±0.5 a	3.8±0.3 a
20	0	41.6±10.13 ab	38.3±6.0 a	65.0±7.6 a	1.8±0.1 c	2.2±0.3 bc
	25	31.6±1.6 ab	10.0±2.8 b	40.0±2.8 bcd	3.6±0.1 a	3.2±0.3 ab
	50	22.6±4.3 bc	15.0±5.7 b	36.6±4.4 cd	3.8±0.4 a	3.3±0.2 ab
	100	16.6±1.6 c	7.6±1.4 b	16.6±1.6 e	3.6±0.2 a	3.4±0.2 ab
Time		0.108	0.585	0.639	0.069	0.845
Concentration		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Time × Concentration		0.406	0.742	0.448	0.276	0.153

^{a,b,c,d,e}Means with different letters in a column are statistically different (Tukey; p≤0.05). ^{❖ a,b,c,d,e}Las medias con letra diferente en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; p≤0.05).

yeast *Sporidiobolus pararoseus*. The total percent contamination decreased as AgNPs concentration increased. The lowest total percent contamination was observed in treatments exposed to 100 mg L⁻¹

concentraciones de AgNP y los tiempos de inmersión. Los contaminantes identificados fueron la bacteria *Pseudomonas psychrotolerans* y la levadura *Sporidiobolus pararoseus*. El porcentaje de contaminación total

AgNPs regardless of the duration of explant exposure. By contrast, the highest total percent contamination was found in control treatments with no AgNPs. When assessing fungal and bacterial contamination, the lowest fungal percent contamination was obtained at 100 mg L⁻¹ for 5 min and at 50 and 100 mg L⁻¹ for 10 and 20 min, respectively. The highest bacterial contamination was observed in treatments without AgNPs at all time points evaluated. Contamination decreased with higher AgNPs concentrations. The analysis of length and number of leaves per shoot showed that all shoots displayed more vigorous growth when subjected to different AgNPs exposure times and concentrations. Explants not exposed to AgNPs had the shortest length and number of leaves per shoot.

This study showed that AgNPs achieved an effective reduction of contamination during *in vitro* establishment of shoots and promoted shoot multiplication of vanilla. Particularly, the AgNPs were effective against *P. psychrotolerans* and *S. pararoseus*. The aseptic establishment of vanilla was obtained with high concentrations of disinfecting agents such as sodium hypochlorite (Lee-Espinosa *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2011; Zuraida *et al.*, 2013) and mercury chloride (Giridhar and Ravishankar, 2004; Janarthanam and Seshadri, 2008; Rethesh and Bhat, 2010). However, sodium hypochlorite provides a low efficiency and mercury chloride is phytotoxic.

Consequently, the use of AgNPs as antimicrobial agents has become more widespread. AgNPs can be an efficient tool for removing contaminants from plant tissues, but only if the right dose and exposure times are used (Mahna *et al.*, 2013). Our results show that the use of AgNPs significantly decreases total contamination, and these results are consistent with reports on the *in vitro* establishment of different plant species (Rostami and Shahsavari, 2009; Fakhreshani *et al.*, 2012; Mahna *et al.*, 2013; Arab *et al.*, 2014; Ahmadian *et al.*, 2015).

According to Mahna *et al.* (2013), the possible mechanism by which AgNPs act as a disinfectant agent in this process may relate to the properties of silver itself. Silver ions do not possess a single mode of action; they interact with a wide range of molecular processes within microorganisms, resulting in different effects, such as inhibition of growth and loss of infectivity through cell death (Abdi *et al.*, 2008). Morones *et al.* (2005) suggested that AgNPs affect bacterial membrane permeability by attaching

disminuyó al aumentar la concentración de AgNP. El porcentaje menor de contaminación total se observó en los tratamientos expuestos a 100 mg L⁻¹ de AgNP independiente de la duración de la exposición del explante. En cambio, el porcentaje de contaminación total más alto se encontró en los tratamientos testigos sin AgNP. Al evaluar la contaminación fúngica y bacteriana, el menor porcentaje de contaminación fúngica se obtuvo con la concentración de 100 mg L⁻¹ durante 5 min y a 50 y 100 mg L⁻¹ durante 10 y 20 min, respectivamente. La contaminación bacteriana más alta se observó en los tratamientos sin AgNP en todos los tiempos de evaluación. La contaminación disminuyó con mayores concentraciones de AgNP. El análisis de la longitud y el número de hojas por vástago mostró que todos los vástagos presentaron un crecimiento más vigoroso después de la exposición a diferentes tiempos y concentraciones de AgNP. Los explantes no expuestos a AgNP fueron los de menor longitud y número de hojas por vástago.

Este estudio mostró que las AgNP reducen de forma eficaz la contaminación durante el establecimiento *in vitro* del vástago y promueven la multiplicación del vástago de la vainilla. En particular, las AgNP fueron eficaces contra *P. psychrotolerans* y *S. pararoseus*. El establecimiento aséptico de la vainilla se logró con altas concentraciones de agentes desinfectantes, como el hipoclorito de sodio (Lee-Espinosa *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2011; Zuraida *et al.*, 2013) y el cloruro de mercurio (Giridhar y Ravishankar, 2004; Janarthanam y Seshadri, 2008; Rethesh y Bhat, 2010). Sin embargo, la eficiencia del hipoclorito de sodio es baja y el cloruro de mercurio es fitotóxico.

Por consiguiente, el uso de AgNP como agente antimicrobiano se ha generalizado. Las AgNP pueden ser una herramienta eficiente para eliminar los contaminantes de tejidos vegetales, pero solo si se utiliza la dosis y el tiempo de exposición adecuados (Mahna *et al.*, 2013). Nuestros resultados muestran que el uso de AgNP disminuye significativamente la contaminación total, y estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios sobre el establecimiento *in vitro* de diferentes especies vegetales (Rostami y Shahsavari, 2009; Fakhreshani *et al.*, 2012; Mahna *et al.*, 2013; Arab *et al.*, 2014; Ahmadian *et al.*, 2015).

Según Mahna *et al.* (2013), el mecanismo posible mediante el cual las AgNP actúan como un agente desinfectante en este proceso puede relacionarse con las propiedades de la plata. Los iones de plata no poseen

to the cell membrane surface and modifying the cell potential. The observation of large numbers of nanoparticles inside bacterial cells suggests that this is an important component of the antibacterial mechanism, as we demonstrated herein. Kim *et al.* (2008) investigated the antifungal effects of AgNPs and their mode of action, and found that AgNPs may exert their antifungal activity by disrupting the structure of the cell membrane and inhibiting the normal budding process through the destruction of membrane integrity. Herein, we demonstrated the effectiveness AgNPs against a yeast. The scarce information available on the antimicrobial activity of AgNPs during *in vitro* establishment makes it necessary to study it on various species in order to further support their widespread use.

Gubbins *et al.* (2011) reported that exposing *Lemna minor* to 5 mg L⁻¹ AgNPs led to the inhibition of plant growth and caused phytotoxicity. A study carried out on *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor* by Lee *et al.* (2012) showed a correlation between growth efficiency and AgNPs concentration, with favorable development observed at low concentrations and lesser growth at higher AgNPs concentrations. According to our results, AgNPs produce antifungal and antibacterial effects during *in vitro* establishment of vanilla. Sarmast *et al.* (2015) reported how *T. undulata* explants cultured in MS medium plus AgNPs (30, 60 and 120 mg L⁻¹) increase the percentage of shoots produced, and percentage of generating shoots explants were decreased by AgNPs concentrations above 60 mg L⁻¹. Arruda *et al.* (2015) described how plants exposed to low AgNPs concentrations displayed a faster growth than control plants, but growth decreased at higher AgNPs concentrations. According to Spinoso-Castillo *et al.* (2017), low doses of AgNPs promoted the formation of shoots of vanilla in a temporary immersion system, a response due to the hormetic effect of AgNPs during *in vitro* culture.

Effect of silver nanoparticles on shoot multiplication

During shoot multiplication, no contamination was observed. However, significant differences were detected in shoot number and length among the treatments evaluated (Table 3). Low concentrations of AgNPs increased the number of shoots per explant, length of shoots, and number of leaves during the *in*

único mecanismo de acción; ellos interactúan con un amplio intervalo de procesos moleculares dentro de los microorganismos, que resulta en efectos diferentes, como la inhibición del crecimiento y la pérdida de la infectividad a través de la muerte celular (Abdi *et al.*, 2008). Morones *et al.* (2005) sugirieron que las AgNP afectan la permeabilidad de la membrana bacteriana al adherirse a su superficie y modificar el potencial celular. La observación de grandes cantidades de nanopartículas dentro de las células bacterianas sugiere que esto es un componente importante del mecanismo antibacteriano, como lo demostramos aquí. Kim *et al.* (2008) investigaron los efectos antifúngicos de las AgNP y su mecanismo de acción, y encontraron que las AgNP pueden ejercer su actividad antifúngica al interrumpir la estructura de la membrana celular e inhibir el proceso de gemación normal mediante la destrucción de la integridad de la membrana. Aquí nosotros, demostramos la efectividad de las AgNP contra una levadura. La escasa información disponible sobre la actividad antimicrobiana de las AgNP durante el establecimiento *in vitro* hace necesario estudiarlo en diversas especies para apoyar más su uso generalizado.

Gubbins *et al.* (2011) reportaron que al exponer a *Lemna minor* a 5 mg L⁻¹ de AgNP se inhibió el crecimiento de la planta y causó fitotoxicidad. Un estudio en *Phaseolus radiatus* y *Sorghum bicolor* por Lee *et al.* (2012) mostró una correlación entre la eficiencia del crecimiento y la concentración de AgNP, con un desarrollo favorable a bajas concentraciones y un crecimiento menor a concentraciones más altas de AgNP. Según nuestros resultados, las AgNP producen efectos antifúngicos y antibacterianos durante el establecimiento *in vitro* de la vainilla. Sarmast *et al.* (2015) reportaron como los explantes de *T. undulata* cultivados en medio MS adicionado con AgNP (30, 60 y 120 mg L⁻¹) aumenta el porcentaje de vástagos producidos y el porcentaje de explantes generadores de vástagos disminuía con concentraciones mayores a 60 mg L⁻¹ de AgNP. Arruda *et al.* (2015) describieron como las plantas expuestas a bajas concentraciones de AgNP presentan un crecimiento más rápido que el de plantas testigo, pero el crecimiento disminuyó con concentraciones más altas de AgNP. De acuerdo con Spinoso-Castillo *et al.* (2017), dosis bajas de AgNP promueven la formación de vástagos de vainilla en un sistema de inmersión temporal. Esta respuesta se debe al efecto hormético de las AgNP durante el cultivo *in vitro*.

in vitro multiplication phase of vanilla (Figure 2). But, high AgNPs concentrations negatively affected *in vitro* development (Figure 2D). The highest number of shoots (7.9 per explant) was observed with 50 mg L⁻¹ AgNPs (Figure 2C), followed by 7.3 shoots per explant in 100 mg L⁻¹ AgNPs (Figure 2B). By contrast, the lowest number of shoots per explant (4.3) was found

Efecto de las nanopartículas de plata en la multiplicación del vástago

Durante la multiplicación del vástago, no se observó contaminación. Sin embargo, diferencias significativas se detectaron en el número de vástagos y su longitud entre los tratamientos evaluados (Cuadro

Table 3. Effect of silver nanoparticles (AgNPs) on shoot multiplication of vanilla (*Vanilla planifolia*) in semi-solid medium.
Cuadro 3. Efecto de las nanopartículas de plata (AgNP) en la multiplicación de vástagos de vainilla (*Vanilla planifolia*) en medio semisólido.

AgNPs (mg L ⁻¹)	Contamination (%)	No. of shoots/explant	Shoot length (cm)	Number of leaves
0	0.0±0	4.3±0.3 b	2.1±0.1 b	1.7±0.15 b
25	0.0±0	7.3±0.3 a	4.4±0.1 a	2.5±0.16 a
50	0.0±0	7.9±0.4 a	4.7±0.2 a	2.7±0.15 a
100	0.0±0	3.3±0.3 c	1.7±0.1 c	1.8±0.13 b

^{a,b,c}Means with different letters in a column are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$). ^{❖ a,b,c}Las medias con letra diferente en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$).

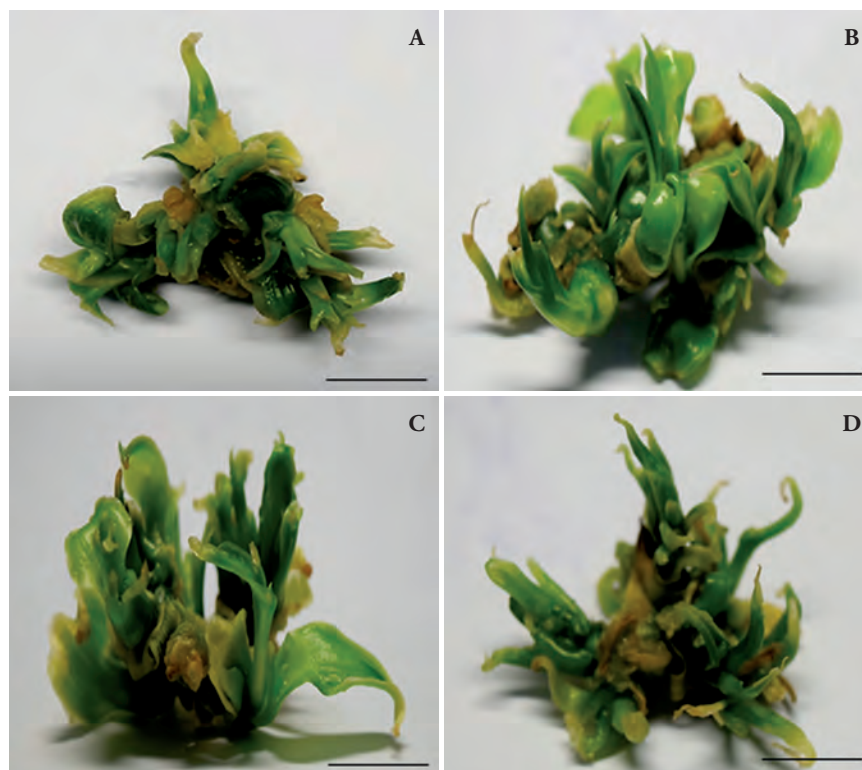


Figure 2. Effect of AgNPs on shoot multiplication micropropagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) after 60 d of culture. (A-D) concentrations represents 0, 25, 50, 100 mg L⁻¹ AgNPs, respectively. Bar=2 cm.

Figura 2. Efecto de las AgNP en la multiplicación de vástagos de vainilla (*Vanilla planifolia*) después de 60 d de cultivo. Las concentraciones en A-D son 0, 25, 50 y 100 mg L⁻¹ de AgNP, respectivamente. Barra=2 cm.

in the control treatment without AgNPs (Figure 2A). Shoot length and number of leaves increased in the culture medium supplemented with 50 mg L⁻¹ AgNPs (Figure 2C).

The application of AgNPs at low concentrations promotes growth and number of leaves in shoots of vanilla. Thus, exposure to specific concentrations of AgNPs may enhance plant growth, as compared to non-exposed plants, but higher concentrations could negatively affect plant growth (Almutairi and Alharbi, 2015). Yin *et al.* (2012) suggested that AgNP-induced damage may cause the loss of gravitropism in roots through disruption of auxin transport. But Spinoso-Castillo *et al.* (2017) explained that an increase in shoot formation *in vitro* cultures due to the effects of auxins is related to apical dominance, since losing apical dominance favors the development of new shoots. However, high concentrations of AgNPs not only affect auxin transport, but also induce phytotoxicity. Probably, phytotoxicity caused by the silver ion reduced shoot number and length.

The dose-response phenomenon, characterized by low-dose stimulation and high-dose inhibition, is called hormesis (Calabrese 2008) and can be “an adaptive compensatory process following an initial disruption in homeostasis” (Calabrese *et al.*, 2016b). Hormetic growth stimulation is frequently observed in plants exposed to low concentrations of non-essential, toxic metal ions (Calabrese and Blain 2009). Sharma *et al.* (2012) showed that 25, 50, and 100 mg L⁻¹ of AgNPs improves shoot and root length, as well as chlorophyll contents in *Brassica juncea*, while 400 mg L⁻¹ adversely affects these variables. In *Ocimum basilicum* the application of 20, 40, and 60 mg L⁻¹ of AgNPs increased plant dry weight, inflorescence dry weight, and seed production, as compared to treatments without AgNPs (Nejatzadeh-Barandozi *et al.*, 2014). Similarly, in *Solanum tuberosum*, 2 mg L⁻¹ AgNPs improved dry weight, root length, and leaf area (Homaei and Ehsanpour, 2015).

Our results agree with Spinoso-Castillo *et al.* (2017), who reported a hormetic effect on the development of vanilla shoots when using the Recipient for Automated Temporary Immersion (RITA[®]) system and exposing them to AgNPs concentrations of 25-200 mg L⁻¹. When exposing shoots to higher AgNPs concentrations (100 and 200 mg L⁻¹), shoot quality decreased. However, temporary immersion systems are not always available

3). Concentraciones bajas de AgNP aumentaron el número de vástagos por explante, la longitud de los vástagos y el número de hojas durante la fase de multiplicación *in vitro* de la vainilla (Figura 2). Pero, concentraciones altas de AgNP afectaron de forma negativa el desarrollo *in vitro* (Figura 2D). El número de vástagos más alto (7.9 por explante) se observó con 50 mg L⁻¹ de AgNP (Figura 2C), seguido por 7.3 vástagos por explante a 100 mg L⁻¹ de AgNP (Figura 2B). En cambio, el número más bajo de vástagos por explante (4.3) se observó en el tratamiento testigo sin AgNP (Figura 2A). La longitud del vástago y el número de hojas aumentaron en el medio de cultivo con suplemento de 50 mg L⁻¹ AgNP (Figura 2C).

El uso de AgNP a bajas concentraciones promueve el crecimiento y el número de hojas en vástagos de vainilla. Así, la exposición a concentraciones específicas de AgNP puede potenciar el crecimiento vegetal, comparado con las plantas no expuestas, pero concentraciones mayores podrían afectar de forma negativa el crecimiento vegetal (Almutairi y Alharbi, 2015). Yin *et al.* (2012) sugirieron que el daño inducido por las AgNP puede causar la pérdida de gravitropismo en las raíces por la interrupción del transporte de auxinas. Pero, Spinoso-Castillo *et al.* (2017) explicaron que el aumento en la formación de vástagos en cultivos *in vitro* debido a los efectos de las auxinas está relacionado con la dominancia apical, ya que la pérdida de la dominancia apical favorece el desarrollo de nuevos vástagos. Sin embargo, las altas concentraciones de AgNP no afectan solo el transporte de auxinas, también inducen fitotoxicidad. Es probable que la fitotoxicidad causada por el ion plata redujo el número de vástagos y su longitud.

El fenómeno de dosis-respuesta, caracterizado por la estimulación por dosis bajas y la inhibición por dosis altas, se llama hormesis (Calabrese 2008) y puede ser “un proceso adaptativo de compensación después de una alteración inicial en la homeostasis” (Calabrese *et al.*, 2016b). La estimulación hormética del crecimiento se observa con frecuencia en las plantas expuestas a bajas concentraciones de iones metálicos tóxicos, no esenciales (Calabrese y Blain 2009). Sharma *et al.* (2012) mostraron que 25, 50 y 100 mg L⁻¹ de AgNP mejoran la longitud del vástago y la raíz, y el contenido de clorofila en *Brassica juncea*, mientras que 400 mg L⁻¹ tienen efecto negativo en estas variables. En *Ocimum basilicum*, la aplicación de 20, 40 y 60 mg L⁻¹ de AgNP aumentó el peso seco de la planta,

when plants are produced at commercial scale, which can be a drawback for this technology. According to Spinoso-Castillo *et al.* (2017), the effect observed in the hormetic shoot micropropagation phase may be explained as follows: an increase in shoot production and length (in the case of Argovit at 25 mg L⁻¹ and 50 mg L⁻¹) is probably due to the accumulation of N and Mg, as this response is observed at all Argovit concentrations evaluated. Thus, further studies should be conducted on silver nanoparticles, focusing on residual particles in tissues, genotoxic effects, and somaclonal variation.

Rooting and acclimatization

All shoots obtained from the treatments with AgNPs formed roots in MS medium without the addition of growth regulators. During the acclimatization stage, treatments with AgNPs did not influence plant survival under greenhouse conditions (Figure 3). The survival rate was between 98-100% for all treatments.

CONCLUSIONS

The use of AgNPs can be an alternative for micropropagation of vanilla (*Vanilla planifolia*). Lower

el peso seco de la inflorescencia y la producción de semilla, comparado con los tratamientos sin AgNP (Nejatzadeh-Barandozi *et al.*, 2014). Similarmente, en *Solanum tuberosum*, 2 mg L⁻¹ de AgNP mejoraron el peso seco, la longitud de la raíz y el área de la hoja (Homae y Ehsanpour, 2015).

Nuestros resultados coinciden con Spinoso-Castillo *et al.* (2017), quienes reportaron un efecto hormético en el desarrollo de vástagos de vainilla al usar el sistema RITA[®] (Recipiente de Inmersión Temporal Automatizada) y exponerlos a concentraciones de AgNP de 25-200 mg L⁻¹. Al exponer los vástagos a concentraciones mayores de AgNP (100 y 200 mg L⁻¹), la calidad del vástago disminuye. Sin embargo, los sistemas de inmersión temporal no siempre están disponibles cuando las plantas se producen a escala comercial, lo cual puede ser una desventaja al usar esta tecnología. De acuerdo con Spinoso-Castillo *et al.* (2017), el efecto observado en la fase hormética de la micropropagación del vástago se puede explicar así: es probable que un aumento en la producción y longitud de vástagos (en el caso de Argovit a 25 mg L⁻¹ y 50 mg L⁻¹) se deba a la acumulación de N y Mg, ya que esta respuesta se observó en todas las concentraciones de Argovit evaluadas. Así, se deben realizar estudios adicionales de las nanopartículas de plata, enfocados



Figure 3. Vanilla (*Vanilla planifolia*) plantlets acclimatization from *in vitro* culture with silver nanoparticles. A) Plantlets established in plastic trays containing agrolite/peatmoss (1:2); B) individual plant in pots.

Figura 3. Aclimatación de plántulas de vainilla (*Vanilla planifolia*) obtenidas de cultivos *in vitro* con nanopartículas de plata. A) Plántulas establecidas en bandejas de plástico con agrolita/musgo de turba (1:2); B) planta individual en maceta.

concentrations of AgNPs cause a hormetic effect in the *in vitro* culture of this plant species.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: by the International Bionanotechnology Network-CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) of Mexico; and Tomsk Polytechnic University Competitiveness Enhancement Program, grant VIU-TOVPM-316/2017 (Russia).

LITERATURE CITED

- Abdi, G., H. Salehi, and M. Khosh-Khui. 2008. Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiol. Plant.* 30: 709-714.
- Ahmadian, M., A. R. Babaei, S. Shokri, S. Hessami, and M. M. Arab. 2015. Controlling the *in vitro* contamination of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) single nodes explant by Nano-silver. *Int. J. Agric. Biol.* 4: 167-170.
- Almutairi, Z. M., and A. Alharbi. 2015. Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. *Adv. Agric. Biol.* 4: 283-288.
- Arab, M. M., A. Yadollahi, M. Hosseini-Mazinani, and S. Bagheri. 2014. Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on *in vitro* establishment of G × N15 (hybrid of almond × peach) rootstock. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 12: 103-110.
- Arruda, S. C., A. L. Silva, R. M. Galazzi, R. A. Azevedo, and M. A. Arruda. 2015. Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta* 131: 693-705.
- Bello-Bello, J. J., R. A. Chávez-Santoscoy, C. A. Lecona-Guzmán, N. Bogdanchikova, J. Salinas-Ruiz, F. C. Gómez-Merino, and A. Pestryakov. 2017. Hormetic response by silver nanoparticles on *in vitro* multiplication of sugarcane (*Saccharum* spp. cv. Mex 69-290) using a temporary immersion system. *Dose-Response* 15: 1559325817744945.
- Borrego, B., G. Lorenzo, J. D. Mota-Morales, H. Almanza-Reyes, F. Mateos, E. López-Gil, N. de la Losa, V. A. Burmistrov, A. N. Pestryakov, A. Brun, and N. Bogdanchikova. 2016. Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus *in vitro* and *in vivo*. *Nanomedicine* 12: 1185-1192.
- Buzea, C., H. Pacheco, and K. Robbie. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *The American Vacuum Society. Biointerphases* 2: 17-71.
- Calabrese, E. J. 2008. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 1451-1474.
- Calabrese, E. J. 2016a. Preconditioning is hormesis. Part I: Documentation, dose-response features and mechanistic foundations. *Pharmacol. Res.* 110: 242-264.
- Calabrese, E. J. 2016b. Preconditioning is hormesis. Part II: How the conditioning dose mediates protection: Dose optimization within temporal and mechanistic frameworks. *Pharmacol. Res.* 110: 265-275.
- Calabrese, E. J., and R. B. Blain. 2009. Hormesis and plant biology. *Environ. Poll.* 157: 42-48.

a las partículas residuales en los tejidos, efectos genotóxicos y variación somaclonal.

Enraizamiento y aclimatación

Todos los vástagos obtenidos de los tratamientos con AgNP formaron raíces en el medio MS sin la adición de reguladores de crecimiento. Durante la etapa de aclimatación, los tratamientos con AgNP no afectaron la supervivencia de la planta bajo condiciones de invernadero (Figura 3). La tasa de supervivencia fue 98 a 100% para todos los tratamientos.

CONCLUSIONES

El uso de AgNP puede ser una alternativa para la micropropagación de la vainilla (*Vanilla planifolia*). Concentraciones más bajas de AgNP desencadenan un efecto hormético en el cultivo *in vitro* de esta especie.

—Fin de la versión en Español—



- Fakhrfeshani, M., A. Bagheri and A. Sharifi. 2012. Disinfecting effects of nano silver fluids in gerbera (*Gerbera jamesonii*) capitulum tissue culture. *J. Biol. Env. Sci.* 6: 121-127.
- Gantait, S., and S. Kundu. 2017. *In vitro* biotechnological approaches on *Vanilla planifolia* Andrews: advancements and opportunities. *Acta Physiol. Plant.* 39: 196.
- Giridhar, P., and G. A. Ravishankar. 2004. Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. under influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk. *Indian. J. Biotechnol.* 3: 113-118.
- Gubbins, E. J., L. C. Batty, and J. R. Lead. 2011. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environ. Pollut.* 159: 1551-1559.
- Homaei, M. B., and A. A. Ehsanpour. 2015. Physiological and biochemical responses of potato (*Solanum tuberosum*) to silver nanoparticles and silver nitrate treatments under *in vitro* conditions. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 20: 353-359.
- Jampilek, J., and K. Králová. 2018. Benefits and potential risks of nanotechnology applications in crop protection. *In: Abd-Elsalam, K., and R. Prasad (eds). Nanobiotechnology Applications in Plant Protection. Nanotechnology in the Life Sciences. Springer, Cham.* pp: 189-246.
- Janarthanam, B., and S. Seshadri. 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant.* 44: 84-89.
- Ju-Nam, Y., and J. R. Lead. 2008. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci. Total Environ.* 400: 396-414.
- Kim, K. J., W. S. Sung, S. K. Moon, J. S. Choi, J. G. Kim, and D. G. Lee. 2008. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 1482-1484.

- Lee-Espinosa, H. E., J. Murguía-González, B. García-Rosas, A. L. Córdova-Contreras, and A. Laguna-Cerda. 2008. *In vitro* clonal propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). HortScience 43: 454-458.
- Lee, W. M., J. I. Kwak, and Y. J. An. 2012. Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: media effect on phytotoxicity. Chemosphere 86: 91-499.
- Ma Y., L. Kuang, X. He, W. Bai, Y. Ding, Z. Zhang, Y. Zhao, and Z. Chai. 2010. Effects of rare earth oxide nanoparticles on root elongation of plants. Chemosphere 78: 273-279.
- Mahna, N., S. Z. Vahed, and S. Khani. 2013. Plant *in vitro* culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of *ex vitro* explants. J. Nanomed. Nanotechnol. 4:1.
- Mishra, S., and H. B. Singh. 2015. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99: 1097-1107.
- Morones, J. R., J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramírez, and M. J. Yacaman. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 16: 2346-2353.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Nejatzadeh-Barandozi, F., F. Darvishzadeh, and A. Aminkhani. 2014. Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of *Ocimum basilicum* L. Bioorg. Med. Chem. Lett. 4: 11. doi: 10.1186/s13588-014-0011-0
- Ramírez-Mosqueda, M. A., and L. G. Iglesias-Andreu. 2016. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT[®], BIG, and RITA[®]) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro* Cell Dev Biol-Plant. 52: 154-160.
- Razzaq, A., R. Ammara, H. M. Jhanzab, T. Mahmood, A. Hafeez, and S. Hussain. 2015. A novel nanomaterial to enhance growth and yield of wheat. J. Nanosci. Nanotechnol. 2: 55-58.
- Retheesh, S. T., and A. I. Bhat. 2010. Simultaneous elimination of Cucumber mosaic virus and Cymbidium mosaic virus infecting *Vanilla planifolia* through meristem culture. Crop Prot. 29: 1214-1217.
- Rostami, A. A., and A. Shahsavar. 2009. Nano-silver particles eliminate the *in vitro* contaminations of olive "Mision" explants. Asian J. Plant Sci. 8: 505-509.
- Sarmast, M. K., A. Niazi, H. Salehi, A. Abolmoghdam. 2015. Silver nanoparticles affect ACS expression in *Tecomella undulata* *in vitro* culture. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 121: 227-236.
- Sarmast, M. K., H. Salehi, and M. Khosh-Khui. 2011. Nano silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of *Araucaria excelsa* R. Br. var. *Glauca* explants. Acta Biol. Hung. 62: 477-484.
- Sharma, P., D. Bhatt, M. G. H. Zaidi, P. P. Saradhi, P. K. Khanna, and S. Arora. 2012. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. Appl. Biochem. Biotechnol. 167: 2225-2233.
- Spinoso-Castillo, J. L., R. A. Chávez-Santoscoy, N. Bogdanchikova., J. A. Pérez-Sato, V. Morales-Ramos, and J. J. Bello-Bello. 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 Tiss. Organ Cult. 129: 195-207.
- Stovbun, S. V., A.V. Kiselev, A.M. Zanin, T. S. Kalinina, T. A. Voronina, A. I. Mikhailov, and A. A. Berlin. 2012. Effects of physicochemical forms of phenazepam and Panavir on their action at ultra-low doses. Bull. Exp. Biol. Med. 153: 455 - 458.
- Tan, B. C., C. F. Chin, P. Alderson. 2011. Optimization of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 105: 457-463.
- Vazquez-Muñoz, R., M. Avalos-Borja, and E. Castro-Longoria. 2014. Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. PLoS ONE. 9: e108876. doi: 10.1371/journal.pone.0108876
- Yin, L., B. P. Colman, B. M., McGill, J. P., Wright, and E. S. Bernhardt. 2012. Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. PLoS One 7:e47674. doi: 10.1371/journal.pone.0047674
- Zuraida, A. B. R., K. H. F. L. Izzati, O. A. Nazreena, W. S. W. Zaliha, C. M. Z. C. Radziah, S. Sreeramanan. 2013. A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Vanilla planifolia*. Amer. J. Plant Sci. 4: 1685-1692.

