

Exposure of rice plants (*Oryza sativa* L.) to silver nanoparticles affects the expression of NAC multifunctional genes

La exposición de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) a nanopartículas de plata afecta la expresión de genes multifuncionales NAC

Vilchis-Zimuta, Robert¹; Gómez-Merino, Fernando Carlos^{1*}; Bello-Bello, Jericó Jabín²;
Alcántar-González, Gabriel¹; Trejo-Téllez, Libia Iris¹

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Montecillo, Texcoco, Estado de México. C.P.

²Cátedra CONACYT-Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Amatlán de los Reyes, Veracruz, México.

*Autor para correspondencia: fernandg@colpos.mx

ABSTRACT

Objective: We aimed to evaluate the effect of silver nanoparticles (AgNPs) on the expression of 17 NAC genes in rice plants (*Oryza sativa* L.) under greenhouse conditions.

Methodology: Twelve-d-old rice seedlings were transferred to a hydroponic system. Fourteen days after the transplant, the following treatments were applied through the nutrient solution: 0, 20, 40 and 80 mg L⁻¹ AgNPs. Each solution had six repetitions which were distributed in a completely randomized experimental design. From the treated and control plants, total RNA was extracted from stems, from which cDNA was synthesized and a measurement of gene expression was performed by the qRT-PCR technique. The elongation factor 1 α , which showed greater stability, was taken as the reference gene. The relative expression of the genes was determined using the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method, with a differential expression value of 2.

Results: It was found that the AgNPs induced the expression of four NAC genes (*Os02g56600*, *Os07g04560*, *Os12g43530* and *Os06g5107*) by at least one dose of AgNPs tested, and one gene (*Os08g10080*) showed repression of expression by the presence of these nanoparticles in the nutrient solution. In the *Os07g04560* gene, the expression was dependent on the concentration of AgNPs, that is, the higher the concentration of AgNPs in the medium, the greater the expression of the gene.

Limitations: In further studies, it would be necessary to explore the expression of more NAC genes in different tissues and phenological stages of the plant.

Conclusions: It is concluded that silver nanoparticles differentially affect the expression of NAC genes in rice, which confirms the multifunctionality of these genes in plants.

Keywords: Gene expression, qRT-PCR, NAC genes.

RESUMEN

Objetivo: El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las nanopartículas de plata (AgNPs) en la expresión de 17 genes *NAC* en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) en invernadero.

Metodología: Plántulas de arroz de 12 d de edad se trasladaron a un sistema hidropónico. Catorce días después del trasplante se aplicaron los siguientes tratamientos a través de la solución nutritiva: 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs. Cada tratamiento tuvo seis repeticiones en un diseño experimental completamente al azar. De las plantas tratadas y del testigo se extrajo RNA total de vástago, a partir del cual se sintetizó cDNA y se realizó una medición de la expresión génica por la técnica de qRT-PCR. Como gen de referencia se tomó el *Factor de elongación 1α*, que mostró mayor estabilidad. La expresión relativa de los genes se determinó utilizando el método 2^{-ΔΔCt}, con un valor de expresión diferencial de 2.

Resultados: Se encontró que las AgNPs indujeron la expresión de cuatro genes *NAC* (*Os02g56600*, *Os07g04560*, *Os12g43530* y *Os06g5107*) por al menos una dosis de AgNPs probada, y un gen (*Os08g10080*) mostró represión de la expresión por la presencia de estas nanopartículas en la solución nutritiva. En el gen *Os07g04560*, la expresión fue dependiente de la concentración de AgNPs, esto es, a mayor concentración de AgNPs en el medio, mayor expresión del gen.

Limitaciones: En este estudio no fue posible analizar la expresión de genes *NAC* en respuesta a AgNPs en otros tejidos y en otras etapas fenológica.

Conclusiones: Las nanopartículas de plata afectan diferencialmente la expresión de genes *NAC* en arroz, lo que corrobora la multifuncionalidad de estos genes en plantas.

Palabras clave: Expresión génica, qRT-PCR, genes *NAC*.

crecimiento de raíces (Pittol *et al.*, 2017). De acuerdo con Cox *et al.* (2016), las AgNPs afectan germinación, crecimiento y actividad fotosintética, mediante estrés oxidativo, citotoxicidad y genotoxicidad, y la magnitud del efecto depende del tamaño de la nanopartícula, la forma, su encapsulado, el uso de acarreadores, el genotipo de planta y las condiciones experimentales.

A nivel molecular se ha estudiado poco el efecto de la aplicación de AgNPs, en particular los efectos que tienen en la inducción o represión de factores de transcripción de genes de la familia *NAC*. Estos genes constituyen una familia única en plantas (Pei *et al.*, 2013), y son considerados multifuncionales, pues participan en el control de procesos, tales como el crecimiento, desarrollo, y respuesta a factores de estrés biótico y abiótico (Shao *et al.*, 2015). El objetivo de esta investigación fue analizar los efectos que concentraciones crecientes de AgNPs aplicadas a plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) en condiciones de hidroponía en invernadero, tienen en la regulación de la expresión de genes *NAC* en vástago.

MATERIALES Y MÉTODOS

En esta investigación se utilizaron semillas de arroz cv. Morelos A-98 (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) del Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)-Zacatepec, Morelos, México, (18° 39' N, 99° 12' O, a 910 m de altitud). Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 70% por 10 min, después se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se sumergieron por 1 h en NaClO al 5% al cual se le adicionó Tween® 20 al 0.08% (Hycel; Zapopan, Jalisco, México).

INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas de plata (AgNPs) tienen propiedades únicas especialmente como agentes antimicrobiales (Li *et al.*, 2009; Lubick, 2008). Actualmente, en la agricultura las AgNPs, han abierto una ventana de oportunidades en la estimulación del crecimiento y la protección vegetal (Ávalos *et al.*, 2013). De acuerdo con Pallavi *et al.* (2016), las aplicaciones de AgNP a concentraciones de 50 mg kg⁻¹ en *Vigna sinensis*, y 75 mg kg⁻¹ en *Brassica juncea* estimularon algunas variables de crecimiento. En *Phaseolus vulgaris*, Das *et al.* (2018) reportaron que la aplicación de 25 a 50 mg AgNPs kg⁻¹ aumentó el índice de área foliar, número de hojas, contenido de clorofilas, actividad nitrato reductasa y el rendimiento. En *Nicotiana tabacum* las AgNPs promovieron el enraizamiento de explantes en condiciones *in vitro* (Thangavelu *et al.*, 2018). En *Saccharum* spp., Bello-Bello *et al.* (2017) reportaron que las AgNPs incrementan la concentración de especies reactivas de oxígeno y la peroxidación lipídica en concentraciones de 0, 25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹, aunque a concentraciones de 25 a 50 mg AgNPs L⁻¹, se estimula el crecimiento e incrementa la concentración de nitrógeno en tejido vegetal; sin embargo, las AgNPs pueden tener efectos adversos en algunas especies. En *Allium cepa*, expuestas a 0.001 mg AgNPs L⁻¹ mostraron inhibición del

Las semillas desinfectadas, se colocaron y secaron sobre papel filtro estéril. Posteriormente las semillas se depositaron en frascos de vidrio cuyo interior contenían medio MS (Sigma-Aldrich; Steinheim, Alemania) con 3% de sacarosa (J. T. Baker; Center Valley, PA, EEUU) y 0.8% de agar (Merck; Darmstadt, Alemania). Posteriormente los frascos se colocaron en oscuridad a 28 °C por 3 d, después fueron expuestos a luz natural por 11 d.

Una vez que las plántulas alcanzaron 14 d de edad se transfirieron a un sistema hidropónico en condiciones de invernadero a una temperatura promedio de 28 °C/15 °C (día/noche), humedad relativa de 60% con 16 h luz a 159 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 8 h oscuridad. Se usaron recipientes plásticos de 8 L con solución nutritiva Yoshida (Yoshida et al., 1976), que tiene la siguiente composición: 1.43 mM NH_4NO_3 , 1.00 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.64 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.32 mM K_2SO_4 , 320 μM NaH_2PO_4 , 100 μM Fe-EDTA, 7.99 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.15 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.08 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 1.39 μM H_3BO_3 . Catorce días después del trasplante se aplicaron los siguientes tratamientos a través de la solución nutritiva: 0, 20, 40 y 80 mg AgNPs L^{-1} . La solución nutritiva fue renovada cada ocho d. El pH de la solución se ajustó a 5.5 utilizando H_2SO_4 o NaOH 1 N. A los 32 d después de haber iniciado los tratamientos (plantas de 46 d de edad) las plantas fueron cosechadas, enjuagadas con agua destilada estéril y divididas en vástago y raíz. Las muestras de vástagos fueron almacenadas a -80 °C, para su posterior procesamiento.

Extracción de RNA y síntesis de cDNA

De las muestras de vástago identificadas, almacenadas a -80 °C, se extrajo de RNA, utilizando Trizol (Invitrogen; Carlsbad, CA, EEUU), siguiendo el protocolo de la casa comercial. Se adicionó DNasa (Promega; Madison, WI, EEUU), a fin de digerir restos de DNA interfiriente en la reacción de qRT-PCR. Se cuantificó RNA total utilizando un nanoespectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific; Wilmington, DE, EEUU), el un gel de agarosa al 1% se corrió en un equipo Mini-Sub Cell GT Systems (Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU), y se visualizó la cantidad y calidad de las moléculas en un equipo foto documentador (ChemiDoc XRS+ Imaging System, Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU). Se comparó la relación entre absorbancias 260/280 y 260/230, y sus de bandas en gel de electroforesis. El RNA total se diluyó a 625 ng μL , y se procedió con la síntesis de 5000 ng de cDNA, en un volumen final de reacción de 20 μL ,

usando el kit SuperScript[®]III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen; Carlsbad, CA, EEUU), siguiendo el protocolo de la casa comercial.

Selección de genes NAC, genes de referencia e iniciadores usados

Las secuencias de los iniciadores de los genes NAC y los genes de referencia (Cuadro 1), fueron seleccionados con base en Caldana et al. (2007), Riaño-Pachón et al. (2007) y Pérez-Rodríguez et al. (2009). Del total de 57 genes NAC depositados en la base de datos Plant Transcription Factors DabaBase (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>), para este estudio se seleccionaron 17 que mostraron la mayor reproducibilidad en estudios previos bajo nuestras condiciones experimentales. Los genes de referencia usados fueron *Actina* (*Os03g50890*), *Actina 1* (*Os05g36290*), *Factor de elongación 1 α* (*Os03g08020*) y *β -tubulina* (*Os01g59150*).

La mezcla de PCR contenía 2 μL de cDNA a una concentración de 10 ng μL^{-1} , 7.5 μL de 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, EEUU), y 1.9 μL de cada iniciador de los genes a 2 μM , en un volumen final de 15 μL . También se llevaron a cabo reacciones por triplicado de PCR para cada gen de referencia. La reacción qRT-PCR se realizó con base a Caldana et al. (2007), García-Morales et al. (2014) y Moreno-Alvarado et al. (2017), en un detector de secuencia ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems). Los valores de estabilidad de expresión (M) de los genes de referencia se calcularon de acuerdo con Vandesompele et al. (2002). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con cuatro tratamientos y seis repeticiones. El perfil de expresión génica fue analizado con el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ descrito por Livak y Schmittgen (2001) y Schmittgen y Livak (2008). Se tomó un valor de 2 para determinar si los genes eran inducidos (+2) o reprimidos (-2) respecto al gen de referencia establecido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El RNA total extraído, fue de calidad y en cantidad suficiente como se observa en el Cuadro 2. El índice de pureza A_{260}/A_{280} (Cuadro 2), presentó valores superiores a 2.0 y las relaciones A_{260}/A_{230} fueron superiores a 1.8, lo que indica que el RNA es de buena calidad.

Selección de genes de referencia

En este estudio se calculó la estabilidad de la expresión (M) de los genes de referencia con base en Vandesompele

Cuadro 1. Lista de iniciadores específicos usados para el análisis qRT-PCR de factores de transcripción NAC de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) en respuesta a tratamientos de AgNPs.

TIGR v5.0	Nombre del gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
Os02g56600	<i>NAM protein, putative</i>	TACCAGATGTGGCGAAGCTG	TACTTGCAGTTCGCGGAA
Missing annotation	<i>NAM protein, putative</i>	GGAAGAGAAATCCTCCTGCCT	TGCTCTGGTTGCACGGTTT
Os01g66490	<i>NAM protein, putative</i>	GCCGGCAGCCACAACATATAG	TTGGTTGATGCGACGACG
Os01g15640	<i>NAM protein, putative</i>	TGCAAAGTGCGATGTTCCAA	ATGGCTCGATCCTTTCCAGTG
Os07g04560	<i>Hypothetical protein</i>	GCAACGTGAACGGTGGCTAC	GCTGCTACTGTTCCATTGCTCC
Os09g32040	<i>Similar to NAM-like protein 7</i>	CGGAAAATCAGATGTTGCGG	GCGCACGTATTCTCTGCCAT
Os12g43530	<i>NAM protein, putative</i>	GATTTTCATCCGACGGATCAAGA	TCACCTTTGGAAGATCCCAGG
Os06g51070	<i>NAM-like protein</i>	CATCCCCGACACCATGCAAT	CCTTCCGGTAGACCTTGCGAGA
Os09g33490	<i>Similar to NAC</i>	TCGTCGTCGAGCTGTGTCA	CCTCTCTTTGAGAGGCAGATGG
Os11g31330	<i>NAM protein, putative</i>	AAATACCTCTACCCCCGTGCTTT	CAACATCGGTGATGATCGCA
Os04g35660	<i>NAM protein, putative</i>	ATTGAATGGTAAAGCACTCCAATCC	GTCTGCGTCGCATGACTGAA
Missing annotation	<i>NAM protein, putative</i>	GGTCGAGATCGGCCTCAAATA	ACACAGAACAAGCTCGTCGGAG
Os03g59730	<i>NAM protein, putative</i>	GTATCGCATCCCCGAGTTTC	TGTAAGCAGGCGGTTTGAATC
Os07g13920	<i>NAM protein, putative</i>	CGATCAGAACCAACAGGATTGG	AGTCATCGCCATCACACAGA
Os10g21560	<i>Putative transcription factor</i>	GGAATGACCATAACGCAGCTG	CAAAACCCTTGTTAGGTGGACT
Os04g40130	<i>Salt-inducible protein</i>	TTACACGGACGAAACGGACCT	AGTGTGATCCCCATCCACCC
Os08g10080	<i>NAC domain protein NAC1</i>	CCTCTCCACCTCAAGGTGAAGACA	CGCAATCCGAACGAAGAACAACAA
Os03g50890	<i>Actin</i>	CTCCCCCATGCTATCCTTCG	TGAATGAGTAACCACGCTCCG
Os05g36290	<i>Actin 1</i>	ATCCTTGATGCTAGCGGTGCGA	ATCCAACCGGAGGATAGCATG
Os03g08020	<i>EF1α</i>	GTCATTGGCCACGTCGACTC	TGTTTCATCTCAGCGGCTTCC
Os01g59150	<i>β-Tubulin</i>	GGAGTCACATGCTGCCTAAGGTT	TCACTGCCAGCTTACGGAGG

Cuadro 2. Indicadores de cantidad y calidad del RNA total extraído de vástago plantas de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) expuesto a diferentes concentraciones de AgNPs en condiciones hidropónicas en invernadero.

Tratamiento	Concentración de RNA total ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	Relación 260/280	Relación 260/230
Control	1032.9	2.08	1.94
20 mg L ⁻¹ AgNPs	1257.5	2.03	1.88
40 mg L ⁻¹ AgNPs	2088.0	2.12	2.23
80 mg L ⁻¹ AgNPs	1132.4	2.08	1.85

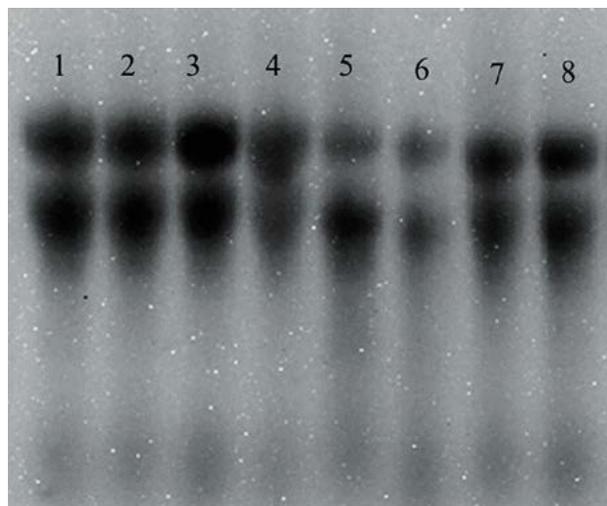


Figura 1. Electroforesis en gel al 1% de agarosa que ilustra la corrida de las muestras de RNA total extraídas de vástagos de plantas de *Oryza sativa* L. ssp. *indica* expuestas a 0, 20, 40 y 80 mg AgNPs L⁻¹ condiciones hidropónicas en invernadero. Carriles 1-2: Control; 3-4: 20 mg L⁻¹ AgNPs; 5-6: 40 mg L⁻¹ AgNPs; 7-8: 80 mg L⁻¹ AgNPs.

et al. (2002) (Cuadro 3). De acuerdo con esta fuente, entre más bajo es el valor de M, mayor estabilidad representa el gen de referencia para tomarlo como base para estudios de expresión génica.

El Factor de elongación 1α (*EF1α*; *Os03g08020*) presentó el menor valor de M, por lo que se tomó como gen de referencia para los análisis de expresión génica de los genes NAC evaluados en este estudio.

Cuadro 3. Valores de estabilidad de la expresión (*M*) de los genes de referencia probados para el análisis de qRT-PCR en vástagos de arroz en respuesta a AgNPs, con base en Vandesompele et al. (2002).

Gen	Locus Identifier	Estabilidad de expresión (<i>M</i>)		
		Repetición 1	Repetición 2	Media
<i>Actina</i>	<i>Os03g50890</i>	0.111	0.130	0.121
<i>Actina 1</i>	<i>Os05g6290</i>	0.130	0.145	0.137
<i>Factor de elongación 1α</i>	<i>Os03g08020</i>	0.095	0.107	0.101
β -tubulina	<i>Os01g59150</i>	0.104	0.173	0.139

Cuantificación de la expresión génica de factores de transcripción NAC

La cuantificación de la expresión de genes NAC por qRT-PCR se muestra en la Figura 2. Es posible observar que hubo cuatro genes NAC (*Os02g56600*, *Os07g04560*, *Os12g435030* y *Os06g5107*) cuya expresión fue estimulada por al menos una dosis de AgNPs probada, y un gen NAC (*Os08g10080*) cuya expresión fue reprimida por la presencia de estas nanopartículas en la solución nutritiva.

El gen de referencia tomado como base para hacer los cálculos de expresión génica de los genes NAC fue el *Factor de elongación 1 α* (*EF1 α* ; *Os03g08020*), el cual mostró el menor valor de *M*, y por tanto, la mayor estabilidad para propósitos

de este estudio. De los cuatro genes NAC inducidos por las nanopartículas de plata se observa que el gen *Os02g56600* muestra inducción de la expresión en plantas expuestas a 20 y 80 mg AgNPs L⁻¹, pero no a 40 mg AgNPs L⁻¹. El gen que mostró mayor inducción fue el *Os07g04560*, en los tres niveles de AgNPs probados. Fue importante notar que el nivel de inducción de este gen se incrementó a medida que la concentración de las nanopartículas se aumentaba en la solución nutritiva.

A 40 mg AgNPs L⁻¹, los genes *Os12g43530* y *Os06g5107* también mostraron inducción en respuesta a la exposición de las plantas a AgNPs, pero no a concentraciones de 20 y 80 mg AgNPs L⁻¹. Por el contrario, el gen *Os12g4353* mostró represión

de su expresión en plantas tratadas con 20 mg AgNPs L⁻¹.

El único gen NAC que mostró represión en su expresión fue *Os08g10080*, en las tres dosis de AgNPs probadas. En este caso, los niveles de expresión fueron muy similares entre los tratamientos de AgNPs probados.

En *Arabidopsis thaliana* se identificaron 286 genes inducidos y 81 genes reprimidos en respuesta a la aplicación de 5 mg AgNPs L⁻¹ con tamaño de 20 nm por 10 d. Los genes inducidos estuvieron asociados a toxicidad por metales y estrés oxidativo, en tanto que los reprimidos se asociaron a respuestas a patógenos y a estímulos hormonales (Kaveh et al., 2013). En nuestro estudio, coincidentemente hubo un mayor número de genes inducidos que reprimidos.

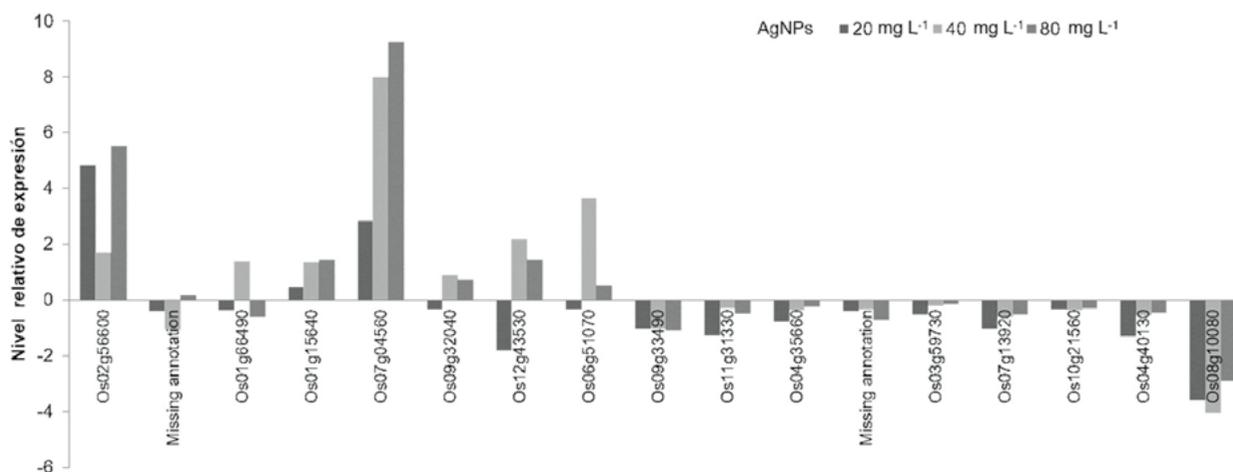


Figura 2. Niveles de expresión relativa de genes NAC en vástagos de plantas de arroz expuestas a diferentes niveles de nanopartículas de plata (AgNPs) en solución nutritiva en condiciones de hidroponía en invernadero.

Syu *et al.* (2014) reportaron en *A. thaliana* que la exposición a AgNPs indujo la expresión de genes relacionados con la síntesis de ácido indolacético (indoleacetic acid protein 8; IAA), actividad oxigenasa (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase; NCED3), y deshidratación (dehydration-responsive RD22). Lo anterior demuestra que estas nanopartículas actúan como inhibidores de la percepción de etileno y que pueden interferir en la biosíntesis de esta fitohormona, además de que inducen la acumulación de ROS, promueven el crecimiento de raíces, y activan la expresión de genes involucrado en diferentes procesos celulares como proliferación, metabolismo, y rutas de señalización hormonal.

Hasta el momento no existen en la literatura estudios que demuestren que algún tipo de factores de transcripción como son los NAC respondan a AgNPs, por lo que esta investigación es pionera. Para conocer más a detalle estas respuestas inducidas por AgNPs en arroz, será necesario realizar mayores análisis a nivel fisiológico, bioquímico y molecular.

CONCLUSIONES

De los 17 genes NAC probados en este estudio, cinco de ellos mostraron expresión diferencial en plantas tratadas con AgNPs respecto a plantas control. De estos cinco genes expresados diferencialmente en las condiciones experimentales evaluadas, cuatro de ellos mostraron inducción, y uno de ellos mostró represión de su expresión en presencia de AgNPs. Además, dentro de los cuatro genes sobre-expresados, uno mostró represión de su expresión con la menor dosis de AgNPs probada. Es importante destacar que este es un estudio pionero que por primera vez demuestra que los genes NAC también responden a la presencia de AgNPs.

LITERATURA CITADA

- Ávalos, A., Haza, A.I., Mateo, D., and Morales, P. (2013). Silver nanoparticles: Applications and toxic risks to human health and environment. *Revista Complutense de Ciencias Veterinaria*, 7, 1-23.
- Bello-Bello, J.J., Chavez-Santoscoy, R., Lecona-Guzmán, C., Bogdanchikova, N., Salinas-Ruiz, J., Gómez-Merino, F.C., Pestryakov, A. (2017). Hormetic response by silver nanoparticles on *in vitro* multiplication of sugarcane (*Saccharum* spp. cv. Mex 69-290) using a Temporary Immersion System. *Dose-Response*, 15(4), 62-72.
- Caldana, C., Scheible, W.R., Mueller-Roeber, B., Ruzicic, S. (2007). A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. *Plant Methods*, 3, 1-9.
- Cox, A., Venkatachalam, P., Sahi, S., Sharma, N. (2016). Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 147-163.
- Das, P., Barua, S., Sarkar, S., Karak, N., Bhattacharyya, P., Raza, N., Kim, K., Bhattacharya, S. (2018). Plant extract-mediated green silver nanoparticles: Efficacy as soil conditioner and plant growth promoter. *Journal of Hazardous Materials*, 346, 62-72.
- García-Morales, S., Gómez-Merino, F.C., Trejo-Téllez, L.I. (2014). NAC transcription factor expression, amino acid concentration and growth of elite rice cultivars upon salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(7), 1927-1936.
- Kaveh, R., Li Y., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C., van Aken, B. (2013). Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environmental Science and Technology*, 47(18), 10637-10644.
- Li, W., Xie, X., Shi, Q., Zeng, H., Ou-Yang, Y., Chen, Y. (2009). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 1115-1122.
- Livak, K., Schmittgen, T. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lubick, N. (2008). Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles-or both? *Environmental Science and Technology*, 42(23), 8617-8617.
- Moreno-Alvarado, M., García-Morales, S., Trejo-Téllez, L. I., Hidalgo-Contreras, J., Gómez-Merino, F.C. (2017). Aluminum enhances growth and sugar concentration, alters macronutrient status and regulates the expression of NAC transcription factors in rice. *Frontiers in Plant Science* 8: 73.
- Pallavi, Mehta, C.M., Srivastava, R., Arora, S., Sharma, A.K. (2016). Impact assessment of silver nanoparticles on plant growth and soil bacterial diversity. *Biotech* 6: 254.
- Pei, H., Ma, N., Tian, J., Luo J., Chen, J., Li J., Zheng, Y., Chen, X., Fei, Z., Gao, J. (2013). An NAC transcription factor controls ethylene-regulated cell expansion in flower petals. *Plant Physiology*, 163(2), 775-791.
- Pérez-Rodríguez, P., Riaño-Pachón, D., Corrêa, L., Rensing, S., Kersten, B., Mueller-Roeber, B. (2009). PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research*, 38, D822-D827.
- 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 and Management*, 8 (2017), 127-133.
- Riaño-Pachón, D., Ruzicic, S., Dreyer, I., Mueller-Roeber B. (2007). PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 42.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3, 1101-1108.
- Shao, H., Wang, H., Tang, X. (2015). NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Frontiers in Plant Science*, 6, 902.
- Syu, Y., Hung, J., Chen, J., Chuang, H. (2014). Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 57-64.
- Thangavelu, R.M, Gunasekaran D., Jesse M.I., Sundarajan D.S.U.M., Krishnan K. (2018). 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(1), 48-61.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., van Roy, N., D+de Paepe, A., Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), Research0034.

Yoshida, S, Forno, DA, Cock, JA, Gomez, KA. (1976). *Laboratory Manual for Plant Physiological Studies of Rice*. 3rd. Ed. International Rice Research Institute. Manila, Philippines.

