



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y
FORESTALES**

**Efectos de nanotubos de carbono sintéticos y naturales
biotransformados por *Trichoderma* sp. en el desarrollo de
Zea mays L a través de la estimulación de la fotosíntesis y la
activación de la vía TOR**

Presenta: QFB. Nestor Alejandro Muñoz Ruiz

**Tesis para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biológicas**

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Director de tesis: Dr. Héctor Javier Anselmo Villegas Moreno

Co-directora: Dra. Gladys Juárez Cisneros

Morelia Michoacán
Marzo 2024

El presente trabajo de investigación plasmado en esta tesis se llevó a cabo durante el periodo marzo 2022 - febrero 2024 en el Laboratorio de Interacción Suelo Planta Microorganismo y Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y el Laboratorio de Análisis y Diagnóstico del Patrimonio, (LADIPA) del Colegio de Michoacán con el apoyo de beca por parte del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT).



EL COLEGIO
DE MICHOACÁN



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

Agradecimientos:

El esfuerzo y dedicación dispuesto en este proyecto, no es más que la consecuencia de las personas que estuvieron detrás, impulsando y guiando mi viaje.

Doy gracias a la vida misma, por darme el sostén conferido por mis padres, por los consejos de mi señora madre y las enseñanzas de mi viejo. Agradezco a mi hermano, por su apoyo, confianza y preocupación. Ya que, sin ellos, no se hubiera llegado tan lejos.

A esa persona, que nunca dudo de mí, brindándome su comprensión, cariño, su gran apoyo y amor. Gracias por todo mi futura esposa, Roxana Yughadi Gaona García.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, que sin esperar nada a cambio compartieron sus alegrías, tristezas y el conocimiento necesario para tener una vida llevadera.

Dr. Javier, gracias por su tiempo, confianza y enseñanza otorgados por todo este proceso, ha sido un gusto la estancia en el laboratorio.

Y sin duda alguna, gracias Dra. Gladys por su gran paciencia, dedicación y fortaleza para hacer de mí, una persona más optimista y sobresaliente. Sin usted todo esto no se hubiera logrado.

A mi comité revisor, el Dr. Homero, Dra. Mariela y Dr. Alfonso por el tiempo, esfuerzo y apoyo que dedicaron en este trabajo de investigación, gracias.

Dedicatoria

A mis padres que han hecho de sus hijos los mejores proyectos de su vida, por forjarnos con valores, reglas y trabajo duro.

Mis logros hasta ahora se los debo a ustedes, dentro del que se incluye este.

Dedicado a los progenitores de mis amados padres, por cuidar y llenar de amor a sus queridos nietos, que, aunque me hubiera encantado tenerlos en el presente y mostrarles mis logros, siempre los llevare en mi mente.

Contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
1.1 <i>Zea mays</i>	3
1.2 Nanopartículas	4
1.3 Los Nanotubos de carbono.....	4
1.4 Síntesis química de MWCNTs.....	5
1.5 MWCNTs de origen natural.....	5
1.6 Biotransformación de MWCNTs	6
1.7 Efecto de los MWCNTs sintéticos en la promoción del crecimiento vegetal.....	7
1.8 MWCNTs de origen natural en las plantas	8
1.9 Efecto de nanotubos de carbono sobre el sistema antioxidante	8
1.10 Fotosíntesis	10
1.11 Vía de señalización TOR (Target of rapamycin)	15
1.12 Interacción de la vía TOR y fotosíntesis.....	16
1.13 Interacción de la vía TOR y sistema antioxidante	17
1.14 Proteína S6K y su relación con TOR	17
1.15 Nanopartículas y su relación con TOR	18
2 JUSTIFICACIÓN	19
3 HIPÓTESIS.....	20
4 OBJETIVOS:	20
4.1 OBJETIVO GENERAL:.....	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
5 MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 Obtención de nanopartículas	21
5.2 Preparación de cultivo fúngico: <i>Trichoderma</i> sp.	21
5.3 Caracterización de nanopartículas	22
5.4 Bioensayos con maíz.....	23
5.5 Diseño experimental	26
5.6 Las variables analizadas.....	28

5.7	Análisis estadístico.....	28
6	RESULTADOS.....	29
6.1	Interacción nanopartícula- <i>Trichoderma</i> sp.	29
6.2	Caracterización de nanopartículas	29
6.2.1	Análisis de nanopartículas por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) 30	
6.2.2	Análisis de nanopartículas por Espectroscopía Raman.....	32
6.2.3	Análisis de nanopartículas por microscopía electrónica de barrido (SEM)	36
6.3	Efecto de NPs biotransformadas en la germinación de maíz.....	37
6.4	Efecto de NPs en el desarrollo de maíz.....	40
6.5	Efecto de NPs biotransformadas en la biomasa de maíz.....	46
6.6	Efecto de NPs biotransformadas sobre el contenido de clorofilas en maíz	48
6.7	Efecto de nanopartículas en la vía de señalización TOR-S6K.....	50
7	DISCUSIÓN	52
8	CONCLUSIONES	56
9	REFERENCIAS.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de un cloroplasto que muestra la doble membrana externa y las membranas tilacoides	11
Figura 2 Esquema del flujo de electrones en la membrana tilacoidal para la obtención de las moléculas energéticas	13
Figura 3 Esquema general de las dos fases de la fotosíntesis	14
Figura 4 Modelo propuesto de la vía de señalización TOR.....	15
Figura 5 Obtención y caracterización de nanopartículas a base de carbono	23
Figura 6 Bioensayo de <i>Zea mays</i> y su interacción con nanopartículas cultivadas en caja petri.....	25
Figura 7 Efecto de nanotubos de carbono y NPs de rastrojo en la biomasa de <i>Trichoderma</i> sp.	29
Figura 8 FTIR de nanopartículas de rastrojo y MWCNTs naturales y sintéticos con <i>Trichoderma</i> sp.	31
Figura 9 Espectros Raman de MWCNTs sintéticos, con y sin biotransformación con <i>Trichoderma</i> sp.	33
Figura 10 Espectros Raman de MWCNTs naturales, con y sin biotransformación con <i>Trichoderma</i> sp.....	34
Figura 11 Espectros Raman de NPs de rastrojo, con y sin biotransformación con <i>Trichoderma</i> sp..	35
Figura 12 Micrografías SEM de nanopartículas de rastrojo y MWCNTs naturales y sintéticos prístinos y biotransformados con <i>Trichoderma</i> sp.....	36
Figura 13 Efecto de nanopartículas sin biotransformación en la raíz.	40
Figura 14 Efecto de nanopartículas biotransformadas en la raíz.	41
Figura 15 Efecto de nanopartículas sin biotransformar + el extracto fúngico en la raíz.....	42
Figura 16 Efecto de nanopartículas sin biotransformación en la parte aérea.	43
Figura 17 Efecto de nanopartículas biotransformadas en la parte aérea.	44
Figura 18 Efecto de nanopartículas sin biotransformar + el extracto fúngico en la parte aérea.	45
Figura 19 Efecto de nanopartículas biotransformadas en el peso fresco.....	46
Figura 20 Efecto de nanopartículas biotransformadas en el peso seco.	47
Figura 21 Efecto de nanopartículas biotransformadas en la concentración de clorofila A, B y Total.	49
Figura 22 Efecto de nanopartículas biotransformadas sobre la vía de señalización TOR-S6K en <i>Z. mays</i>	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tratamientos para bioensayos con maíz expuesto a NPs de rastrojo, MWCNTs naturales y sintéticos con y sin biotransformación con <i>Trichoderma</i> sp.....	27
Tabla 2 Germinación de maíz cultivado con 0, 10, 20 y 40 µg/ml de MWCNTs sintéticos con y sin <i>Trichoderma</i> sp.	37
Tabla 3 Germinación de maíz cultivado con 0, 10, 20 y 40 µg/ml de MWCNTs naturales con y sin <i>Trichoderma</i> sp	38
Tabla 4 Germinación de maíz cultivado con 0, 10, 20 y 40 µg/ml de NPs de rastrojo con y sin <i>Trichoderma</i> sp	39

ACRÓNIMOS

Acrónimo	Significado
ATP	Adenosín trifosfato
ADP	Adenosín difosfato
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo con transformación de Fourier
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
MnP	Manganeso peroxidasa
MWCNTs	Nanotubos de carbono de capa múltiple
NPs	Nanopartículas
NTC	Nanotubos de carbono
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S6K	Proteína ribosomal S6 quinasa
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SWCNTs	Nanotubos de carbono de capa simple
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TOR	Target of rapamycin

Resumen

En la actualidad el maíz (*Zea mays* L) es una fuente de alimento importante para el ganado y consumo humano en México. En la producción de maíz se emplean de forma indiscriminada insumos químicos que contaminan el ambiente. Una alternativa para reducir el uso de agroquímicos es mediante nanopartículas como los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) naturales o sintéticos, nanopartículas (NPs) promotoras del crecimiento vegetal. Sin embargo, no se han elucidado los efectos de estas nanopartículas, en otros procesos fisiológicos del desarrollo vegetal. Por otro lado, se ha documentado que procesos biosintéticos a base de hongos, pueden modificar las propiedades físico-químicas de los nanotubos de carbono (NTC). Por lo que, en este trabajo el objetivo fue evaluar los efectos de NPs de rastrojo, MWCNTs naturales y sintéticos con y sin biotransformación por *Trichoderma* sp. en la estimulación del crecimiento de plantas de maíz. Por otro lado, se han estudiado ampliamente los basidiomicetes como hongos capaces de biodegradar NPs a base de carbono, sin embargo, poco se sabe sobre la capacidad para biotransformar MWCNT de hongos como *Trichoderma* sp. Para ello, se expusieron NPs de rastrojo y MWCNTs sintéticos y naturales al crecimiento de *Trichoderma* sp. en bioensayos *in vitro*. Se caracterizaron los nanomateriales mediante Espectroscopía FTIR y Raman, y microscopía electrónica de barrido para evaluar los cambios estructurales causados por la exposición al hongo. Posteriormente se inocularon las semillas de maíz con este material (Nanopartículas-*Trichoderma* sp.). Las variables a evaluar fueron velocidad y porcentaje de germinación, biomasa en plantulas, variables fenotípicas de la parte aérea, raíz principal y clorofila, y se analizó a la proteína S6K mediante western blot. *Trichoderma* sp. biotransformó las estructura y características de los nanomateriales a base de carbono, demostrando que la biotransformación de estas nanopartículas contribuyó a la promoción del crecimiento vegetal, desde estadios de germinación, desarrollo de partes aéreas como subterráneas y la biomasa de *Z. mays*, al mismo tiempo que estimulan la producción de la clorofila. Por otro lado, se está aportando conocimiento nuevo que demuestra que estas nanopartículas participan en la actividad de la vía de señalización TOR-S6K, y tienen una estrecha relación con la actividad fotosintética como mecanismo involucrado en el desarrollo vegetal.

Palabras clave: MWCNTs, biotransformación, *Trichoderma* sp., promoción del crecimiento vegetal, maíz.

Abstract

Currently *Zea mays* is an important food source for livestock and human consumption in Mexico. In the production of maize, chemical inputs that contaminate the environment are used indiscriminately. An alternative to reduce the use of agrochemicals is through nanoparticles such as natural or synthetic multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), plant growth-promoting nanoparticles (NPs). However, the effects of these nanoparticles have not been elucidated in others physiological processes of plant development. On the other hand, it has been documented that fungal-based biosynthetic processes can modify the physical-chemical properties of carbon nanotubes (CNTs). Therefore, the objective of this work was to evaluate the effects of stubble NPs, natural and synthetic MWCNTs with and without biotransformation by *Trichoderma* sp. on the stimulation of the growth of maize. Basidiomycetes have been widely studied as fungi capable of biodegrading carbon-based NPs. However, little is known about the ability to biotransforming MWCNT by fungi such as *Trichoderma* sp. To this end, stubble NPs and synthetic and natural MWCNTs were exposed to the growth of *Trichoderma* sp. through *in vitro* bioassays. The nanomaterials were characterized by FTIR, Raman Spectroscopy, and scanning electron microscopy to evaluate the structural changes caused by the exposure to the fungus. Subsequently, *Z. mays* seeds were inoculated with this material (Nanoparticles-*Trichoderma* sp.). The response variables to be evaluated were speed and percentage of germination; biomass, phenotypic variables of the aerial part, main root, and chlorophyll were evaluated in seedlings, and the S6K protein was analyzed by western blot. *Trichoderma* sp. biotransformed the structure and characteristics of carbon-based nanomaterials, demonstrating that the biotransformation of these nanoparticles contributed to the plant growth promotion, from germination stages, development of aerial and underground parts and the biomass of *Z. mays*, stimulating the production of chlorophyll. On the other hand, new knowledge is being provided that demonstrates that these nanoparticles participate in the activity of the TOR-S6K signaling pathway, and have a close relationship with photosynthetic activity as a mechanism involved in plant development.

Keywords: MWCNTs, biotransformation, *Trichoderma* sp., plant growth promotion, maize.

1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 *Zea mays*

El maíz (*Zea mays* L) es un cereal de importancia económica mundial, es una gramínea de la familia Poaceae, siendo originaria de Mesoamérica y actualmente es el cereal con mayor producción en el mundo (Strable & Scanlon, 2009). En México es ampliamente utilizado en la industria alimentaria, se tienen múltiples formas y maneras de preparar alimentos a partir del maíz y en la ganadería se utiliza como forraje para la alimentación de animales de consumo humano (Perales & Golicher, 2014). Para el 2021 la producción de este cereal fue de más de 27 millones de toneladas, siendo México el séptimo productor de este grano, obteniendo una producción nacional del 88.2% (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2023).

La demanda de cultivos agrícolas como el maíz, requerirá un incremento proporcional de suelos agrícolas cultivables y también de las dosis de insumos químicos que actualmente se utilizan (Pisante et al., 2012). Esto representa una preocupación a la comunidad científica, debido a que el sistema alimentario mundial actual requerirá una “nueva revolución agrícola” basada en la intensificación impulsada por la sostenibilidad y sustentabilidad.

En la agricultura convencional, para la producción de maíz se ha hecho un uso indiscriminado de los fertilizantes químicos, causando a lo largo del tiempo, efectos perniciosos para el medio ambiente, además, la cantidad de fertilizantes químicos que cada vez se requiere para alcanzar la misma producción es creciente. Por ejemplo, se ha reportado que la cantidad de fertilizantes nitrogenados y a base de fósforo aumentó aproximadamente 20 y 7 veces, respectivamente (Bouwman et al., 2013); asimismo, se ha documentado que, en países como China, considerado el mayor consumidor mundial de fertilizantes nitrogenados, hasta el 50% del nitrógeno aplicado, se pierde por volatilización y otro 5-10 % por lixiviación. La pérdida de fertilizantes representa costos muy elevados para la producción agrícola, y un grave problema ambiental. Cifras de 1970 y 2008, mostraron que la cantidad de fertilizante necesaria para producir una tonelada de grano aumentó en más del 300% (Subramanian et al., 2014; Yin et al., 2018). Durante las últimas cuatro décadas, la eficiencia en el uso de nutrientes de los elementos más importantes requeridos por las plantas, incluido el N, P y K, se ha mantenido baja: 30-35%, 18-20% y 35-40%, respectivamente

(Subramanian et al., 2014). La ineficiencia en la entrega y uso de nutrientes por las plantas asegura que los productores agreguen cantidades excesivas, lo que posteriormente conduce a la contaminación ambiental por emisiones, lixiviación y escorrentía. Atendiendo esta problemática, científicos de todo el mundo buscan alternativas sustentables para optimizar la demanda de cultivos agrícolas para la población y reducir costos económico-ambientales (Ye et al., 2020).

1.2 Nanopartículas

El uso de nanopartículas se está estudiando ampliamente para el desarrollo de nuevos insumos para mejorar la producción agrícola y la aplicación de nanomateriales diseñados para la producción agrícola sostenible; estos nanomateriales han sido de gran interés, porque se les atribuyen efectos benéficos para las plantas, por ejemplo, mejoran la retención de nutrientes, la respuesta de la planta ante enfermedades y en consecuencia inducen un mejor rendimiento vegetal (Khan et al., 2017).

Existen diversos tipos de nanopartículas, de origen sintético y también de origen biótico; entre ellas, las nanopartículas a base de carbono como los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) (Kumar et al., 2018).

1.3 Los Nanotubos de carbono

Desde el descubrimiento de los nanotubos de carbono, en 1991 por Iijima, estos han sido de gran interés de estudio en distintos campos de la ciencia y la nanotecnología, en disciplinas como la electrónica, la biomédica y la agricultura. Los nanotubos de carbono están constituidos principalmente por una o varias capas de grafeno que están unidas por fuerzas Van der Waals; dependiendo del número de capas de grafeno que los constituyen se les da su nombre: los nanotubos de carbono de pared simple o Single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) presentan una sola capa de grafeno, mientras que los de pared múltiple, Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) están constituidos con varias capas de grafeno enrolladas concéntricamente de forma tubular con diámetros entre 2- 100 nm. En las últimas décadas los MWCNTs han sido ampliamente estudiados al presentar propiedades fisicoquímicas únicas, como son su reactividad, dureza, tamaño y estructura, a los cuales se les atribuyen sus efectos en los sistemas vegetales (Coleman et al., 2006; Khan et al., 2019). Debido a la estabilidad de los enlaces C=C presentes en los MWCNTs, estos presentan también propiedades mecánicas extraordinarias, que no se había

documentado en otro material (Liu et al., 2014; Thostenson et al., 2001). Se les atribuye propiedades mecánicas, térmicas y electrónicas, su densidad puede ser tan baja siendo hasta una sexta parte que el acero inoxidable, con una rigidez cinco veces mayor que el acero y una resistencia a la rotura 50 veces más alta que el acero (Saifuddin et al., 2013).

1.4 Síntesis química de MWCNTs

Los métodos para la producción de MWCNTs incluyen descarga de arco, ablación con láser y deposición química de vapor, los primeros SWCNTs fueron sintetizados mediante la técnica de descarga de arco en el que se utilizan dos varillas de carbono colocadas de extremo a extremo para posterior vaporizarlas y formar los nanotubos de carbono, en el método de ablación con láser se combina un láser pulsante y un gas inerte a altas temperaturas. El láser pulsado vaporiza el grafito, formando nanotubos de carbono a partir de los vapores. En estos dos métodos se colocan los precursores de carbono y los metales de transición (Co, Ni, Fe) a temperaturas mayores a los 2750 ° C para después condensarlos a temperaturas bajas en algún gas inerte ya sea He o Ar (Elliott et al., 2013). Ahora comúnmente los MWCNTs, son sintetizados a temperaturas que van de 350 ° C a 1000 ° C, por el método de deposición química de vapor, en este se obtienen grandes cantidades de MWCNTs, pero tienen una gran cantidad de defectos, aunque a un precio relativamente bajo. Para este método los precursores del carbono son típicamente C₂H₂, C₂H₄, CH₄ o alcoholes y un catalizador que puede ser el Fe, Co, Ni etc. (Elliott et al., 2013; Liu et al., 2014).

1.5 MWCNTs de origen natural

Desde el descubrimiento de los MWCNTs en 1991, los métodos de obtención de estos nanomateriales eran de origen sintético. Sin embargo, Lara et al. (2017), documentaron la formación de MWCNTs en la naturaleza, obtenidos después de un incendio forestal, en madera incinerada de *Pinus oocarpa*, dichos nanotubos fueron caracterizados por análisis termogravimétrico, espectroscopia Raman, microscopía electrónica de transmisión y rayos X. Dichos hallazgos mostraron que los MWCNTs ahí obtenidos presentaban características estructurales muy similares a los MWCNTs de origen sintético (Lara-Romero et al., 2017). Por otro lado, se han explorado alternativas para generar MWCNTs a partir de precursores de origen biótico, algunas modificaciones del método de deposición química de vapor, han permitido sintetizar nanopartículas a base de carbono a partir de precursores de origen natural, por ejemplo

al utilizar semillas de ajonjolí con altos contenidos en hierro como sustituto del ferroseno o el uso de trementina como precursor de carbono, lo que representa una alternativa ecológica y mediante la cual, se podrían aprovechar también otros compuestos como la biomasa residual vegetal para la obtención de estos nanomateriales, que regularmente son de bajo costo económico, y dotarlos de valor agregado al convertirlos en nanopartículas que pueden tener un impacto positivo sobre el desarrollo vegetal. Estas nanopartículas al ser de origen natural, pueden integrarse a los cultivos de forma segura, sus costos de obtención son muy bajos y no se utilizan métodos químicos para su síntesis, lo cual es un aliciente para reducir los riesgos ambientales derivados de la síntesis química de nanopartículas y de agroquímicos (Afre et al., 2006; Andrews et al., 2006).

1.6 Biotransformación de MWCNTs

Diversos autores sugieren que los efectos de los MWCNTs en los sistemas vivos, son dependientes de las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales como los son su tamaño, el cual les confiere esa oportunidad de translocarse en diferentes tejidos celulares, su reactividad, forma y estructura para poder realizar diversas aplicaciones, como lo son en la investigación de la energía, medicina y ciencias ambientales (Khan et al., 2019).

Estas propiedades se han modificado principalmente mediante tratamientos químicos, sin embargo, en la última década se ha explorado la modificación de las nanopartículas, aprovechando la capacidad de microorganismos para biotransformar compuestos altamente recalcitrantes. Por ejemplo, la capacidad oxidativa de algunos hongos lignolíticos, para degradar polímeros altamente resistentes a la biodegradación. Algunos trabajos pioneros reportaron que diversos hongos, tienen la capacidad de modificar ciertas características estructurales de los MWCNTs, haciéndolos más reactivos, más solubles o modificando la afinidad de estos nanomateriales por los distintos tejidos vegetales y en consecuencia, los efectos en el desarrollo vegetal pueden ser distinto a los ya documentados.

Sin embargo, el proceso de biodegradación o biotransformación sigue siendo un misterio por explorar, ya que aún se desconocen los efectos colaterales del uso de los MWCNTs sintéticos o naturales biotransformados en los sistemas vegetales y microbioma del suelo. Algunos reportes de investigación como lo reportado por (Zhang et al., 2014), compararon la transformación de

SWCNTs con la interacción de tres enzimas lignolíticas: lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa (MnP) provenientes de *Penicillium chrysosporium*, y lacasa obtenida de *Trametes versicolor*, de las cuales estos autores reportaron que la MnP fue capaz de biotransformar los SWCNTs. En un trabajo similar (Ma et al., 2019), evaluaron la degradación de MWCNTs prístinos y oxidados, por *P. chrysosporium* los resultados arrojaron que hubo una degradación parcial de los MWCNTs en un corto periodo de tiempo. En su investigación (Juárez et al., 2021), evaluaron la capacidad de dos especies de hongos (*P. chrysogenum* y *Pleurotus ostreatus*) para biotransformar MWCNTs, mediante la interacción de lacasas y peroxidasas provenientes de estos dos hongos, los resultados indicaron modificaciones estructurales en la superficie de los MWCNTs. Lo anterior sugiere, que algunas enzimas fúngicas extracelulares tienen la capacidad de modificar o biotransformar la estructura y propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales a base de grafeno y en consecuencia sus efectos son distintos en plantas y otros sistemas biológicos. Algunos hongos saprófitos como *Trichoderma*, se han estudiado con fines de control biológico y promoción de crecimiento en plantas, sin embargo, la actividad de este hongo sobre la biodegradación de nanomateriales, aún ha sido poco estudiada, o no está documentado de acuerdo a nuestro acervo de literatura, sin embargo, este deuteromicete se encuentra en una gran variedad de ecosistemas, es un simbiote de diversas especies de plantas, capaz de estimular el crecimiento vegetal (Andrade et al., 2019) y que además juega un rol competitivo con hongos fitopatógenos, impidiendo su establecimiento en la planta (Ghazanfar et al., 2018). Por lo que la capacidad de este hongo para biodegradar MWCNTs, es de gran importancia ecológica y en los cultivos de interés agroalimentario como *Zea mays* (Ghazanfar et al., 2018; Andrade et al., 2019).

1.7 Efecto de los MWCNTs sintéticos en la promoción del crecimiento vegetal

El estudio de los MWCNTs en las plantas, ha sido de gran interés científico, debido a que se les ha atribuido efectos en las plantas, como inducir una mayor captación de agua al interior de las semillas, mejorando y acelerando el proceso de germinación (Lahiani et al., 2017). En su investigación (Tiwari et al., 2014) demostraron que los MWCNTs sintéticos, mejoraron el crecimiento germinativo en semillas de maíz a concentraciones bajas, pero a concentraciones altas lo reducen. Estos investigadores sugieren que la mejora del crecimiento vegetal, fue principalmente causada por un mayor suministro de agua inducida por los MWCNTs. El mayor suministro de agua en consecuencia puede asociarse con efectos en la actividad metabólica

necesaria durante la germinación, causando así la emergencia temprana de la radícula (Khodakovskaya et al., 2013; Lara et al., 2017), otros autores han sugerido que la germinación de semillas expuestas a los MWCNTs se asocia fuertemente a la expresión de genes reguladores de acuaporina (Lahiani et al., 2017).

Los efectos positivos de los MWCNTs, también se han documentado en otros estadios del desarrollo vegetal, donde estas nanopartículas favorecen el establecimiento y captación de agua y nutrientes al mejorar el desarrollo de la arquitectura radical, estimular la síntesis de clorofila y favorecer la tasa fotosintética. Por ejemplo, en un trabajo científico independiente, en cultivo de plantas de *Avena sativa* reportaron que los MWCNTs son asimilados por las plantas en semilla y raíz, una vez absorbidos estimularon la emergencia temprana de la radícula y el crecimiento de la planta, estos efectos los atribuyeron a que los MWCNTs sintéticos estimularon la síntesis de clorofila y en consecuencia la función fotosintética (Joshi et al., 2018).

1.8 MWCNTs de origen natural en las plantas

El estudio de los MWCNTs sintéticos, ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, los efectos de los MWCNTs de origen biótico aún son limitados. Fueron (Lara et al., 2017), quienes demostraron la presencia de MWCNTs de origen natural, hasta entonces desconocidos. Al explorar por primera vez sus efectos de estos MWCNTs naturales en plantas se reportaron efectos similares a los causados por los MWCNTs de síntesis química, los cuales estimularon el desarrollo foliar y radical de plantas forestales como *Eysenhardtia polystachya* (Juárez et al., 2020) y se obtuvo un efecto positivo en la emergencia temprana de semillas de *Z. mays* (Muñoz et al., 2023).

1.9 Efecto de nanotubos de carbono sobre el sistema antioxidante

El uso de MWCNTs sintéticos, también ha sido motivo de interés en procesos metabólicos de protección en plantas contra el estrés oxidativo. Existen diversos tipos de estrés abiótico que pueden conducir a la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las plantas, las cuales son altamente reactivas, causando daños severos en las proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN, provocando de esta manera el estrés oxidativo, para ello la planta tiene una maquinaria de defensa antioxidante para proteger contra los daños del estrés oxidativo (Gill & Tuteja, 2010).

El uso de MWCNTs sintéticos en plantas para contrarrestar el estrés oxidativo, se ha asociado a que estas nanopartículas intervienen en procesos que imitan a las enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la peroxidasa (POX) (Khan et al., 2017). En *Satureja khuzestanica* se demostró que después de la exposición de MWCNTs, el crecimiento de los callos de *S. khuzestanica* mejoró con el aumento de las concentraciones de MWCNTs, también mostró un aumento significativo en la actividad antioxidante (Ghorbanpour & Hadian, 2015). En otro estudio, se encontró que los MWCNTs estimularon el crecimiento de raíces y tallos de *Onobrychis arenaria* y de igual manera mejoran la actividad de la peroxidasa en estas partes de la planta, esto debido a la captación y acumulación de los MWCNTs por la raíz para su posterior translocación en distintos tejidos y células de la planta (Smirnova et al., 2012). En otro estudio, se sometieron plántulas de *Ocimum basilicum* a distintas concentraciones de MWCNTs funcionalizados con diferentes niveles de estrés salino en cada concentración de MWCNTs, encontrando que se puede mejorar los efectos negativos del estrés salino al incrementar los componentes antioxidantes como lo son la actividad de la peroxidasa y catalasa (Gohari et al., 2020).

Además, la aplicación de MWCNTs en semillas de *Thymus daenensis* a concentración de 250 µg/mL, promovió el crecimiento de las plántulas, así mismo los resultados revelaron que a esa concentración puede mejorar la biosíntesis de antioxidantes, en imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM), estos autores mostraron que los MWCNTs pueden cruzar la pared celular de la planta y de esta manera llegar al citoplasma celular (Samadi et al., 2020). Con el cebado de semillas de *Solanum lycopersicum* y en la aplicación vía foliar se encontró que los MWCNTs aumentaron la actividad enzimática (González-García et al., 2019; López-Vargas et al., 2020). En *Daucus carota*, las cantidades de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), una de las especies reactivas de hidrógeno, se redujo mediante la aplicación de MWCNTs a una concentración de 500 mg/L durante 48 h, lo que indica que los niveles de estrés oxidativo disminuyeron (Park & Ahn, 2016), sin embargo, los mecanismos de regulación de las ROS por las nanopartículas son escasos. En *Arabidopsis thaliana* los resultados a la exposición de MWCNTs han sido contrastantes en las actividades enzimáticas antioxidantes, por lo que se supone que los MWCNTs podrían mitigar la toxicidad provocada por el estrés oxidativo (Zhao et al., 2017).

Sin embargo, efectos contrastantes también se han documentado, al reportarse que la exposición de MWCNTs en distintos organismos provoca toxicidad, de los cuales se tiene registro del daño oxidativo irreversible de las proteínas que estos nanomateriales causan en animales terrestres y acuáticos (Patlolla et al., 2011; Seixas et al., 2018).

La generación de ROS, en las plantas puede ser inducida como consecuencia de algún tipo de estrés, pero también de forma típica durante procesos metabólicos en las plantas como la fotosíntesis. Se conoce bien, que en la fotosíntesis se toma la luz solar para impulsar la reducción de CO₂ y la oxidación del agua, dando como producto hidratos de carbono y O₂, todo esto se lleva a cabo mediante reacciones de oxido-reducción. Pero cuando se pierde el equilibrio en estas reacciones entre prooxidantes y antioxidantes, un aumento de prooxidantes promueve la producción de subproductos como lo son los radicales libres, dando lugar al estrés oxidativo (Guerra, 2001). En estudios, en los que se produce estrés por inundación (disminución de oxígeno), la planta cierra sus estomas, causando la disminución de CO₂ en los espacios intracelulares y consecuente la fotosíntesis disminuye, induciendo la formación de ROS, por tal motivo, es de gran interés estudiar la relación entre el sistema antioxidante y la fotosíntesis (Jiménez et al., 2013).

1.10 Fotosíntesis

La vida fotoautótrofa fue uno de los eventos más importante para la existencia de la vida en la tierra como hoy la conocemos, dando origen a la vida aeróbica y todo lo que ello representa. Los primeros organismos fotosintéticos que se han identificado fueron las cianobacterias, capaces de asimilar la luz solar y que contenían la maquinaria específica para generar materia orgánica a partir de CO₂ y H₂O con la liberación de O₂, lo que representó la evolución para diferentes organismos, como las primeras algas y plantas. Existen dos tipos de fotosíntesis, la anoxigénica que es la producción de materia orgánica a partir de materia inorgánica sin la producción de oxígeno y la oxigénica realizada por cianobacterias y plantas (Blankenship, 2014).

En las plantas y en las algas, la fotosíntesis se lleva a cabo en los cloroplastos (Fig. 1), los cuales poseen un tamaño de 5 a 10 µm, de color verde y están localizados en su mayoría en las células mesofílicas de las hojas, cada célula puede contener de 20 hasta 40 cloroplastos (Azcón & Talón, 2008).

El proceso de la fotosíntesis se divide en dos etapas, 1) las reacciones luminosas que se producen dentro de las membranas tilacoidales, siendo estas las que captan la energía luminosa para convertirla en energía química en forma de ATP y NADPH, liberando como subproducto O_2 . 2) el ciclo de Calvin, en el cual se utiliza la energía química producida en la fase lumínica y el CO_2 atmosférico para la síntesis de azúcares de tres carbonos, esta fase se lleva a cabo en el estroma del cloroplasto. Los carbohidratos producidos por el ciclo de Calvin son utilizados para la producción de moléculas complejas, principalmente la glucosa (Murray, 2006). En resumen, la fórmula de la fotosíntesis queda simplificada de la siguiente manera:

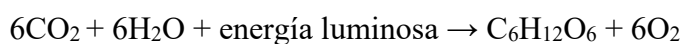


Figura 1. Esquema de un cloroplasto que muestra la doble membrana externa y las membranas tilacoides (Karp, 2017).

Los pigmentos fotosintéticos son los encargados de absorber la luz proveniente del sol, los cuales están ubicados en las membranas tilacoidales de los cloroplastos, la clorofila es el pigmento más importante en la fotosíntesis ya que este, está directamente relacionado en las reacciones que se llevan a cabo en la fase lumínica. Existen distintos tipos de clorofila, a, b, c y d, las principales son la clorofila *a* y clorofila *b*, donde la clorofila *a* es el pigmento implicado primordialmente en la fase lumínica, esta absorbe una longitud de onda de luz azul y rojo anaranjado, que son indicados por los picos en el espectro de absorción de aproximadamente 450-475 nm y 650-675 nm. Mientras que la clorofila *b* transmite la energía absorbida a moléculas de clorofila *a*, por ello es que es considerada un pigmento accesorio (Taiz & Zeiger, 2006).

Los fotosistemas están constituidos por grupos de pigmentos (clorofila *a* y *b*, entre algunos otros), cada grupo consta entre 200 y 300 pigmentos, además de proteínas asociadas. Las reacciones lumínicas son activadas por una clorofila *a* la cual absorbe la energía de un fotón para posterior expulsar un electrón a un receptor primario, a estos dos componentes se les da el nombre de Centro de reacción, no necesariamente la clorofila *a* del centro de reacción tiene que captar los fotones provenientes de la luz, sino que, los demás pigmentos accesorios canalizan la energía a la clorofila *a* en el centro de reacción actuando como complejos antena. A la fecha se han identificado dos fotosistemas, el fotosistema II y el fotosistema I. En el fotosistema II la clorofila *a* del centro de reacción se conoce como *P680* esto porque absorbe mejor la luz a los 680 nm, en el fotosistema I la clorofila *a* del centro de reacción se le denomina *P700*, esto como su nombre lo indica, ya que absorbe mejor la luz en una longitud de onda de 700nm (Murray, 2006).

Los dos fotosistemas en conjunto con el complejo de citocromos y el complejo de ATP-sintasa son el sistema encargado del flujo de electrones en la fotosíntesis, en primera instancia la energía luminosa que llega al centro de reacción de la clorofila *a* en el fotosistema II energiza un electrón que es transmitido al receptor primario (feofitina), el electrón que sale es sustituido por otro proveniente de una molécula de H₂O que es dividida por la enzima OEC, la feofitina manda los electrones a la cadena de transporte de electrones (complejo proteico de citocromos) y de manera indirecta se produce ATP por la ósmosis química producida por el flujo de electrones a través de la ATP sintasa, la cual toma un fosfato inorgánico y lo une al ADP, causando que los electrones sean tomados por la plastocianina (PC) para mandarlos al Fotosistema I, en esta parte se toman los electrones por la ferredoxina para la formación de NADPH (Fig. 2) (Nelson & Junge, 2015).

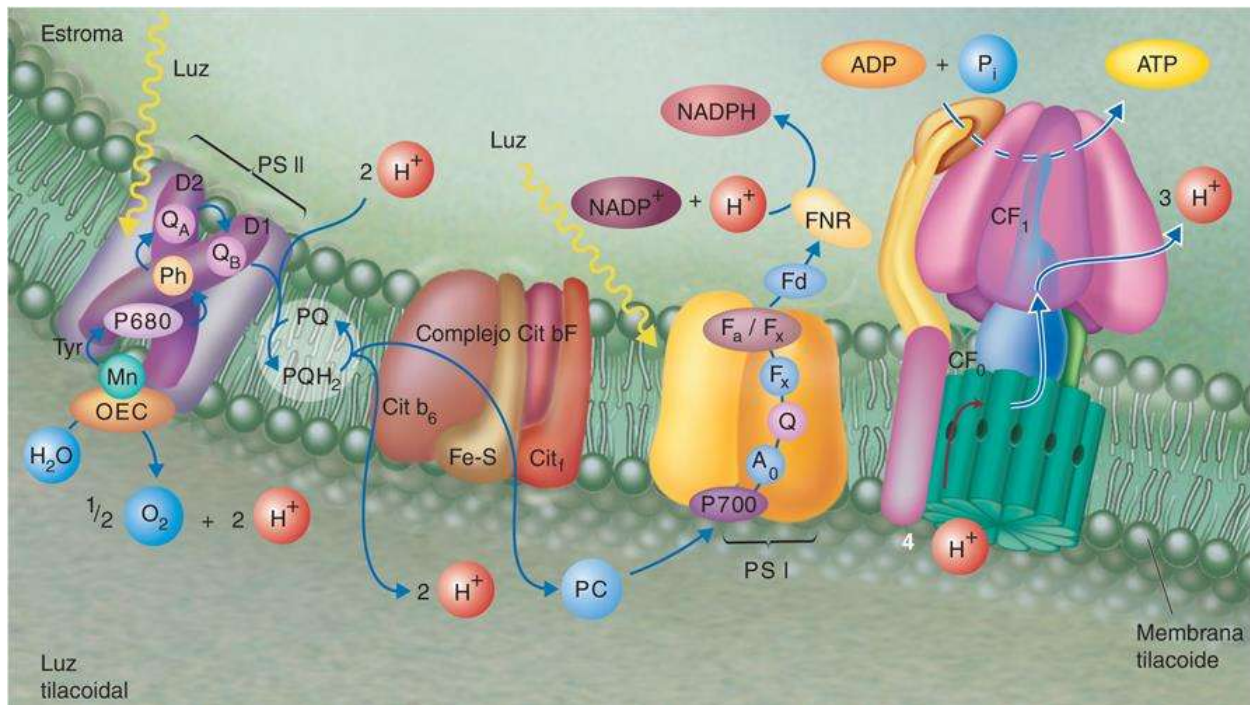


Figura 2. Esquema del flujo de electrones en la membrana tilacoidal para la obtención de las moléculas energéticas (McKee et al., 2016).

Ampliamente se ha documentado que los productos energéticos obtenidos de las reacciones lumínicas, son los que impulsan la segunda parte de la fotosíntesis, para la fijación de CO_2 en carbohidratos (Ciclo de Calvin), en esta fase se llevan a cabo las reacciones oscuras, denominadas así, ya que no dependen de la luz solar para llevarse a cabo, siempre y cuando obtengan los productos de las reacciones luminosas que son el ATP y el NADPH de la fase I. En esta etapa el CO_2 entra a través de los estomas de la planta para posteriormente introducirse al interior de la célula hasta llegar al estroma del cloroplasto, una vez aquí comienza la fijación del carbono (Taiz & Zeiger, 2006).

El CO_2 que entra en el ciclo de Calvin es fijado por una enzima llamada Rubisco, la cual une moléculas del carbono proveniente del CO_2 para formar una molécula más compleja de 5 carbonos (ribulosa-1,5-Bisfosfato), en esta parte, dos moléculas de ATP energizan las dos moléculas de 3 carbonos (3-fosfoglicerato) al añadir fosfatos y convertirlas en 1,3-bisfosfoglicerato, posterior el NADPH añade electrones a los fosfatos de ácidos grasos de tres carbonos para obtener uno de los bloques más importantes de la vida que es el gliceraldehído-3-fosfato (G3P). Un carbono del CO_2 requiere al menos tres vueltas en el ciclo de Calvin para obtener una molécula de G3P, para que

esta pueda abandonar el ciclo y dejar suficientes carbonos para que se regenere la molécula de 5 carbonos (ribulosa-5-fosfato) para de esta manera, continuar los procesos en el ciclo de Calvin. Una vez el G3P fuera del ciclo de Calvin, es utilizado para la formación de azúcares de 6 carbonos, como son la fructosa y la glucosa, que, a su vez, estos dos pueden formar la sacarosa, que está formada de 12 carbonos, la cual es el producto más abundante de la fotosíntesis, la cual juega un rol crucial durante el crecimiento, el desarrollo, la transducción de señales y la aclimatación al estrés del medio ambiente que afecta a las plantas (Fig. 3) (Murray, 2006).

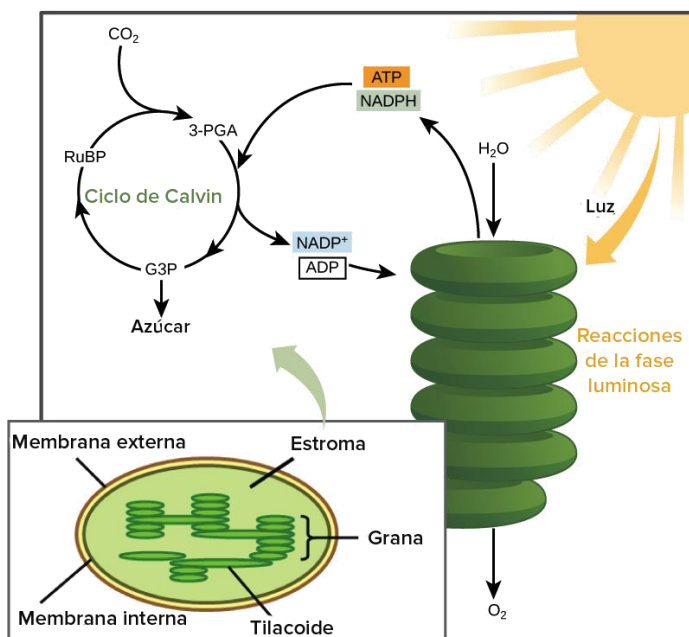


Figura 3. Esquema general de las dos fases de la fotosíntesis (Charles et al., 2015)

La fotosíntesis regula la asimilación de C en el ciclo de Calvin la formación de carbohidratos requeridos para el desarrollo vegetal y colateralmente en este proceso también afecta el sistema antioxidante, en conjunto, ambos factores juegan un rol clave en la regulación de sistemas de señalización críticas del desarrollo vegetal, como la vía de señalización de TOR (TARGET OF RAPAMYCIN).

1.11 Vía de señalización TOR (Target of rapamycin)

El ciclo de vida de las plantas consiste en diferentes etapas de crecimiento, en las cuales sufren eventos desfavorables como lo es el estrés abiótico, la falta de nutrientes, temperaturas elevadas, las sequías, la alta salinidad o déficit nutricional. Para poder combatir contra estas condiciones adversas, las plantas han desarrollado mecanismos metabólicos intracelulares específicos durante todo el crecimiento y desarrollo vegetal. La quinasa TOR, ha sido considerada un regulador clave en el desarrollo de las plantas, animales, levaduras y algas unicelulares (Fu et al., 2020).

TOR es una proteína evolutivamente conservada en los eucariontes, está implicada en la integración de factores hormonales y nutricionales que afectan el crecimiento de las plantas, funciona como un interruptor maestro, que al activarse echa andar casi todos los mecanismos anabólicos en las plantas, es activada por nutrientes y factores de crecimiento, mientras que es inhibido por el déficit de carbohidratos o diversos tipos de estrés (Fig. 4) (Rodríguez et al., 2019).

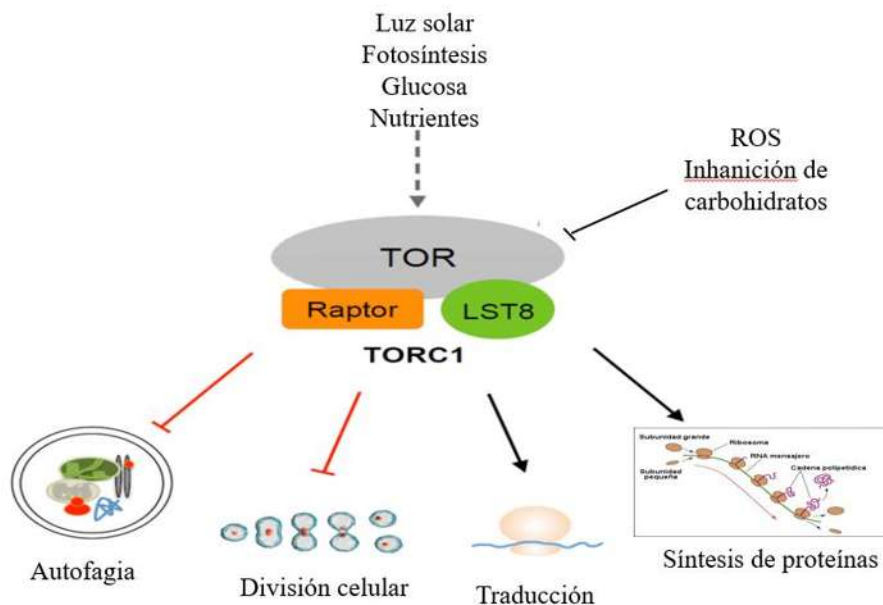


Figura 4. Modelo propuesto de la vía de señalización TOR (Pérez et al., 2017)

TOR es una proteína (Ser/Thr), perteneciente a la familia de las quinasas asociadas con la fosfatidil-inositol-3-quinasa, de la que en mamíferos y levaduras forma parte central de los complejos multiproteicos TORC1 y TORC2, mientras que en plantas solo se ha documentado la

presencia del complejo TORC1 (Pereyra et al., 2020). TORC1 contiene la proteína TOR, RAPTOR y LST8, en tanto que TORC2 tiene TOR y RICTOR entre otras proteínas. Entre los procesos que participa TORC1, se encuentra la regulación de la transcripción, la autofagia, el metabolismo mitocondrial, la biogénesis, síntesis de proteínas y la división celular. Por otro lado, TORC2 modula la organización del citoesqueleto y la polarización de las células (Wu et al., 2019). En las plantas, el estudio de TOR se ha estudiado principalmente en *A. thaliana*, de la cual se tiene un enorme conocimiento, pero es crucial aumentar las investigaciones en distintos sistemas vegetales para aclarar la función de TOR en distintos procesos de desarrollo en plantas y tener un panorama más extenso de todas las implicaciones que tiene este complejo proteico (McCready et al., 2020).

1.12 Interacción de la vía TOR y fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso anabólico más importante en la planta, y en los últimos años, las investigaciones sugieren que TOR juega un rol indispensable en la fotosíntesis. En plantas donde TOR es inhibido se muestran defectos severos en los cloroplastos y colateralmente en la fotosíntesis, los genes implicados en la fotosíntesis suelen estar presentes en las vías anabólicas, las cuales son río abajo, posterior a la inactivación de TOR (Dobrenel et al., 2016; Song et al., 2021).

En *A. thaliana* la inhibición de TOR por AZD8055 provocó la remodelación de la expresión de los genes asociados a la fotosíntesis y a varias fitohormonas, provocando un desfase nutricional y energético (Dong et al., 2015). Además, al inhibir TOR en *Chlorella sorokiniana* los genes involucrados en la fotosíntesis y la fijación del carbono, se redujeron significativamente, demostrando que TOR regula positivamente la fotosíntesis (Li et al., 2022). Por otro lado, en *Chlamydomonas reinhardtii* se encontró que la inhibición de TOR perjudica el mantenimiento del transporte de electrones mitocondrial inhibiendo de esta manera las transiciones de estado eficiente entre los PSII y PSI (Upadhyaya & Rao, 2019). En otro estudio el que se estudió a *C. reinhardtii* estos autores encontraron que la asimilación fotosintética de CO₂ activa eficientemente TOR, probablemente a través de la síntesis de aminoácidos centrales. Este subconjunto de aminoácidos

regulados al alza incluía Glu, Gln, Ala, Val, Leu, Met, Gly y Pro, algunos de los cuales (Ala, Leu, Glu, Gln) se encuentran entre los aminoácidos más abundantes en *Chlamydomonas* (Mallén et al., 2021).

1.13 Interacción de la vía TOR y sistema antioxidante

La relación entre la vía TOR y el sistema antioxidante en las plantas aún es escaso, pero se ha documentado que en condiciones metabólicas y de señalización desfavorables se producen las ROS y un desequilibrio de ellas pueden ser muy tóxicas para las plantas, para esto el glutatión es uno de los principales eliminadores de ROS no enzimáticos, en los últimos estudios se descubrió que Glc-TOR controla la síntesis de glutatión (Rodríguez et al., 2019). Además, Speiser et al. 2018, informó que TOR puede ser estabilizado por condiciones bajo estrés y de esta manera, ser activo para la inducción de síntesis de glutatión, para poder hacer frente a las condiciones adversas contra el estrés oxidativo (Speiser et al., 2018). Por otro lado, se ha documentado que la acumulación de ROS generada por distintos tipos de estrés en las plantas, pueden desempeñar un papel antagónico a la vía de señalización TOR.

1.14 Proteína S6K y su relación con TOR

La proteína ribosomal S6 quinasa (S6K) ha sido ampliamente estudiada al ser un efector muy importante del complejo TORC1, se conoce que TORC1 fosforila y activa a S6K para llevar a cabo funciones como controlar procesos celulares, síntesis de proteínas, crecimiento y tamaño celular en respuesta a los nutrientes, energía y hormonas que los organismos captan del ambiente en el que se encuentren (Magnuson et al., 2012; Schepetilnikov et al., 2013).

En un estudio con *A. thaliana* se encontró que TOR integra la vía de señalización de las auxinas para conectar las vías hormonales y de nutrientes, también se ha demostrado que aguas abajo de TOR, S6K media estas respuestas (Henriques et al., 2014). Aún se sigue estudiando cómo la vía TOR controla procesos clave en las plantas, como la biosíntesis de proteínas, el crecimiento y tamaño celular, la señalización de las auxinas o la senescencia, sin embargo, se ha reportado que una sobreexpresión de S6K1 aumenta el tamaño celular y afecta la homeostasis de la glucosa, al ser esta fosforilada por TOR (Fingar et al., 2002; Van Leene et al., 2019).

1.15 Nanopartículas y su relación con TOR

A la fecha no se cuenta con estudios que demuestren que las nanopartículas están involucradas en los mecanismos de la vía TOR en plantas, aun cuando algunas investigaciones recientes he innovadoras datan que las nanopartículas pueden ser útiles para tratar algunos cánceres en mamíferos, ya que las nanopartículas intervienen en mecanismos que modulan la actividad de mTOR, sin embargo, no se tiene claro cómo se vinculan exactamente (Lunova et al., 2019).

En 2018, Xue y colaboradores trabajaron con nanopartículas de TiO_2 en *Bombyx mori* en donde encontraron que TiO_2 estimula la vía de señalización Akt/Tor, junto con la fosforilación de proteínas, lo importante de este estudio fue localizar los sitios específicos de acción de TiO_2 en el gusano de seda y de esta forma tener una perspectiva más amplia en los estudios que tienen que ver entre NPs y la vía de señalización TOR (Xue et al., 2018).

2 JUSTIFICACIÓN

Se ha documentado que diversos hongos son capaces de modificar las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales y pueden modificar su efecto en los sistemas biológicos. Lo anterior es transcendental para la síntesis verde de nuevos nanomateriales que puedan ser utilizados como insumos en la agricultura de forma segura. Sin embargo, a la fecha se desconocen los efectos de las nanopartículas biotransformadas en el desarrollo vegetal y los posibles mecanismos involucrados en dichos procesos. Por lo que, en este trabajo de investigación, se estudió la capacidad de *Trichoderma* sp. para biotransformar MWCNTs de origen sintético, naturales y a base de biomasa residual, así como el papel que estos juegan antes y después de su biotransformación en el desarrollo de maíz a través de sus efectos en procesos fotosintéticos y en la vía de señalización TOR.

3 HIPÓTESIS

Los MWCNTs naturales, sintéticos y nanopartículas de rastrojo biotransformados por *Trichoderma* sp. mejorarán el desarrollo de *Zea mays* L estimulando la actividad fotosintética y la vía de señalización TOR

4 OBJETIVOS:

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Determinar los efectos de los MWCNTs naturales, sintéticos y de NPs de rastrojo biotransformados en la estimulación del desarrollo de *Zea mays* L, la tasa fotosintética y la vía de señalización TOR.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de los MWCNTs naturales, sintéticos y nanopartículas de rastrojo naturales y sintéticos biotransformados, en variables fenotípicas de crecimiento de *Zea mays* L.
2. Evaluar el efecto de los MWCNTs naturales, sintéticos y nanopartículas de rastrojo naturales y sintéticos biotransformados, sobre la fotosíntesis *Zea mays* L.
3. Evaluar los efectos de MWCNTs naturales, sintéticos y nanopartículas de rastrojo, sobre la vía de señalización de TOR en *Zea mays* L.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de nanopartículas

MWCNTs sintéticos: Se utilizaron para este estudio MWCNTs de origen sintético con las siguientes características: diámetro exterior de 6 a 13 nm, diámetro interno de 2,0 a 4,0 nm, longitud de 2,5 a 20 μm , un espesor de pared medio de 7 a 13 capas de grafeno y una pureza > 98% (Aldrich, Cat 698849).

MWCNTs naturales: Se utilizaron MWCNTs de origen natural obtenidos de muestras de madera quemada de *Pinus oocarpa* de bosques en Michoacán, centro-oeste de México. Los MWCNTs fueron recolectados y purificados de acuerdo con Lara-et al., 2017 y presentaron las siguientes características estructurales: ~10 capas de grafeno, con diámetros interior y exterior de 2.52 nm y 12- 15 nm, respectivamente.

Nanopartículas de rastrojo: Se utilizaron nanopartículas obtenidos por una modificación del método de spray pirólisis húmeda usando como precursor de carbono residuos de maíz (rastrojo) y para generar condiciones anóxicas se utilizó trementina mineral (aguarrás). Para el presente estudio, este material fue analizado previamente a su aplicación, por los métodos de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, espectroscopía Raman y microscopía electrónica de transmisión.

5.2 Preparación de cultivo fúngico: *Trichoderma* sp.

Se inoculó *Trichoderma* sp. en caja Petri en un medio de Potato Dextrose Agar (PDA) por 7 días a 25° C. Posteriormente, se tomaron 3 discos de $\sim 0.5\text{cm}^2$ y se cultivaron en medio líquido papa dextrosa. En matraz con medio líquido se suplementaron MWCNTs naturales y sintéticos en concentraciones de 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$ y 40 $\mu\text{g/mL}$. Se incubaron a 30°C en agitación constante a 150 rpm durante 14 días.

Secado y pulverización de *Trichoderma* sp.-nanopartículas

Después de 14 días de crecimiento de *Trichoderma* sp. en medio líquido, se eliminó el total de H₂O en estufa a una temperatura de 75° C por 8 h. Posteriormente, en balanza analítica, se obtuvo el peso seco fúngico total para evaluar el efecto de las diferentes nanopartículas en el crecimiento de *Trichoderma* sp. Finalmente, se pulverizó el material seco con el hongo-nanomateriales en molino orbital a una frecuencia de 15/s por 30 s para homogeneizar y reducir el tamaño de partícula.

5.3 Caracterización de nanopartículas

Los MWCNTs y las NPs a base de carbono con y sin exposición al crecimiento de *Trichoderma* sp. (pulverizado), se caracterizaron por los siguientes métodos analíticos:

Las muestras se calcinaron a 650 °C por 3 h, posteriormente se realizó la caracterización de nanomateriales para evaluar el efecto de *Trichoderma* sp. sobre los cambios estructurales de los nanomateriales (Fig. 5).

- Espectroscopía Raman (Thermo Scientific)
- Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (Frontier FT-IR / NIR, Perkin Elmer)
- Microscopía electrónica de barrido (JEOL, model JSM-6390LV)

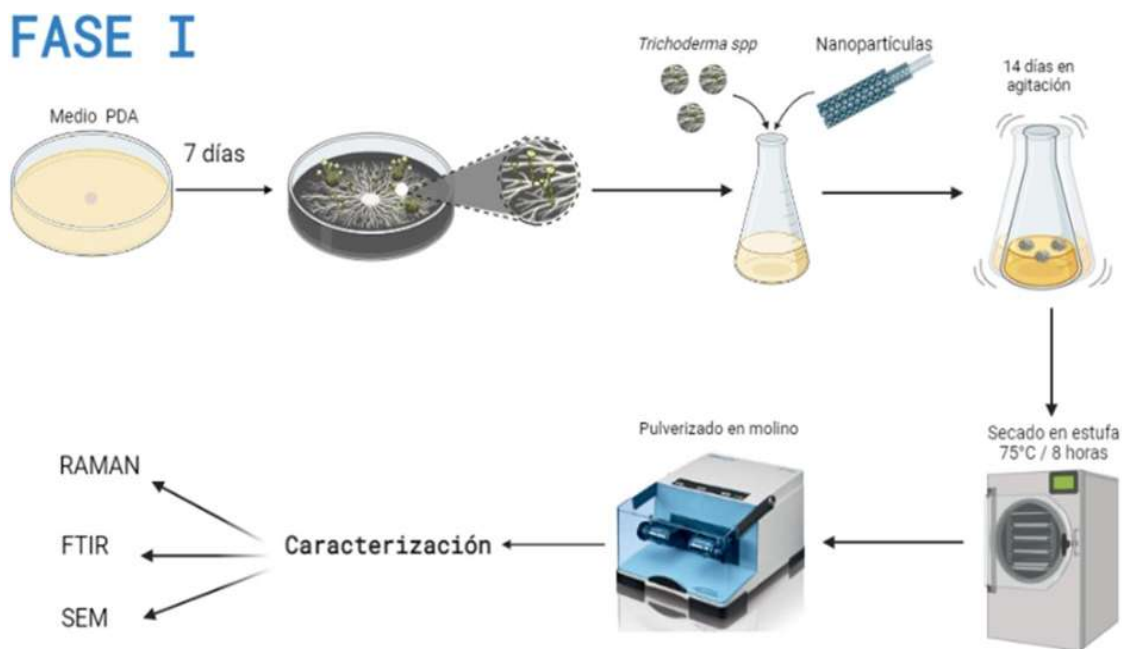


Figura 5. Obtención y caracterización de nanopartículas a base de carbono

5.4 Bioensayos con maíz

Para el establecimiento de bioensayos con maíz y nanopartículas, se utilizaron semillas de *Z. mays* L de la variedad Chalqueño, las cuales se impregnaron durante 24 h con el inóculo, de la siguiente manera: 1) semilla + nanopartículas expuestas al crecimiento del *Trichoderma* sp. por 14 días. 2) nanopartículas sin exposición al hongo y 3) nanopartículas + biomasa fúngica de *Trichoderma* sp. cultivado sin nanopartículas (mezclados) (pulverizado-secado), cada uno con las siguientes concentraciones: 10 $\mu\text{g}/\text{semilla}$, 20 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ y 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$, posteriormente se cultivaron en caja Petri con papel filtro, después de 3 días. Se evaluó el porcentaje y velocidad de germinación de las semillas 30, 42 y 54 h después de la siembra.

Posteriormente las semillas germinadas se trasplantaron en macetas de polipropileno con un diámetro de 12.5 cm y 25 cm de altura con agrolita previamente esterilizada 40 min a 121°C y 1atm de presión, colocando 4 plántulas por maceta y se mantuvieron las plántulas en casa sombra a temperatura de $\sim 25^\circ\text{C}$ durante 28 días, mismas que fueron suplementadas con solución nutritiva de Steiner cada tres días (Steiner, 1961).

La cuantificación de la clorofila se llevó a cabo por espectrofotometría a plántulas de 21 días de crecimiento.

Después de 28 días de crecimiento, las plántulas se cosecharon y se eliminaron los residuos de agrolita de las raíces. Después, se midió la altura de las plantas y longitud de la raíz principal. También se obtuvo el peso fresco de las plántulas en balanza analítica, posteriormente, las plántulas se llevaron a secado en estufa a 60° C por 24 h para obtener el peso seco.

En la figura 6 se muestra el diagrama general del establecimiento de bioensayos de maíz y su interacción con nanopartículas.

FASE II

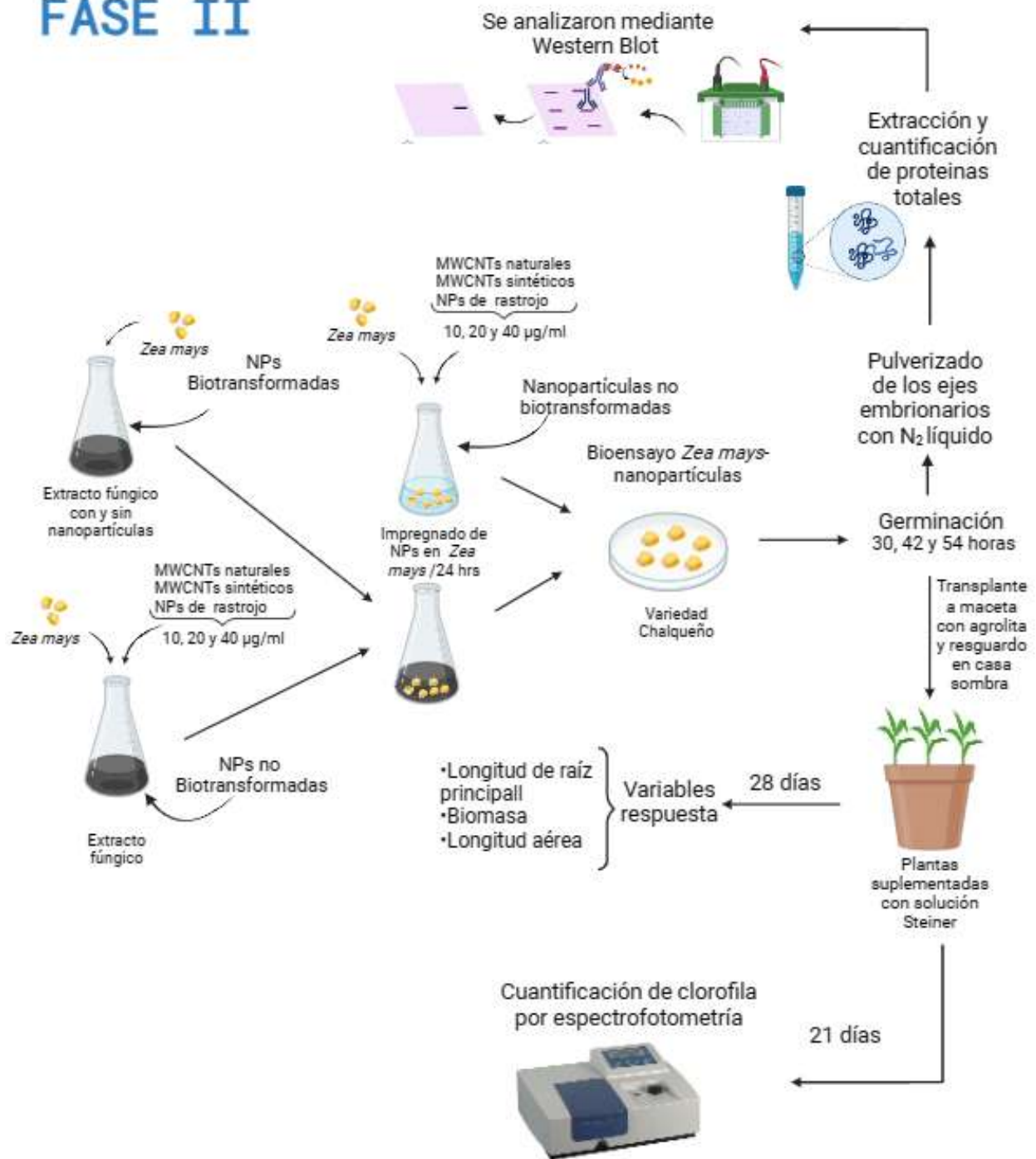


Figura 6. Bioensayo de *Zea mays* y su interacción con nanopartículas cultivadas en caja Petri

Para evaluar la vía de señalización TOR se realizó la extracción de proteínas totales de los ejes embrionarios de tres días de desarrollo. Estos ejes embrionarios se pulverizaron con N₂ líquido, al polvo obtenido se le agregó buffer de extracción de S6K, las muestras se llevaron a centrifuga a

9500 G durante 30 min a 4° C, a continuación, se obtuvo el sobrenadante para la cuantificación de proteínas totales mediante Técnica de Bradford.

Western Blot: Las muestras (10 µg de proteína) se separaron mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS- PAGE) al 12%, para lo cual se utilizó el marcador de peso de proteínas de Bio-Rad y la electroforesis se realizó a 140 volts durante aproximadamente una hora. Una vez terminado el tiempo de la electroforesis, los geles se retiraron de las placas de vidrio y se enjuagaron con agua desionizada para retirar los residuos del buffer de corrida y se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) por 60 minutos a 1 mA por cm² de gel. Las membranas con las proteínas se incubaron con los anticuerpos primarios (IgG de ratón anti-S6K y IgG de ratón anti-pS6K a una dilución de 1:5000 con 5% de polivinilpolipirrolidona) a 4°C con agitación durante toda la noche. Posteriormente a la membrana se le retiró el anticuerpo primario y se realizaron lavados con T-TBS (2 con 1M y 2 con 0.15M) por 10 minutos en agitación y se le colocó el anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa a una dilución de 1:5000 con 5% de polivinilpolipirrolidona) durante dos horas en agitación a temperatura ambiente, una vez terminado el tiempo, se realizaron lavados con T-TBS 0.15M (3 lavados) por 5 minutos en agitación y finalmente se realizó el revelado usando luminol como sustrato (Li-cor) y mediante el equipo Chemi-Doc (Bio-Rad), las imágenes fueron obtenidas y analizadas con el software Image Lab (Bio-Rad) (Fig. 6).

5.5 Diseño experimental

Para este trabajo de investigación se realizó un diseño experimental completamente aleatorio, con un control y 28 tratamientos, cada uno con sus correspondientes concentraciones de nanopartículas y extracto fúngico, dispuestos como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1. Tratamientos para bioensayos con maíz expuesto a NPs de rastrojo, MWCNTs naturales y sintéticos con y sin biotransformación con *Trichoderma* sp

Tratamiento	Nanopartícula suplementada (µg/semilla)	Interacción nanopartícula- <i>Trichoderma</i> sp
Control	0	NO
<i>Trichoderma</i> sp sin NPs	0	
MWCNTs naturales	10	
	20	
	40	
MWCNTs sintéticos	10	
	20	
	40	
NPs de rastrojo	10	
	20	
	40	
MWCNTs naturales	10	Biotransformación de nanopartículas con <i>Trichoderma</i> sp
	20	
	40	
MWCNTs sintéticos	10	
	20	
	40	
NPs de rastrojo	10	
	20	
	40	
MWCNTs naturales	10	<i>Trichoderma</i> sp + Nanopartículas
	20	
	40	
MWCNTs sintéticos	10	
	20	
	40	
NPs de rastrojo	10	
	20	
	40	

Nota: Las plántulas fueron suplementadas con una solución Steiner convencional cada tres días.

5.6 Las variables analizadas

- Biomasa seca de *Trichoderma* sp. cultivado en medio de cultivo suplementado con diferentes concentraciones de MWCNTs naturales, sintéticos y nanopartículas de rastrojo.
- Evaluación de la velocidad y porcentaje de germinación de las semillas de *Z. mays* en bioensayo *in vitro*.
- Análisis de la longitud de la raíz principal, altura de la planta y biomasa vegetal.
- Cuantificación de clorofila en plántulas por espectrofotometría.
- Fosforilación de la proteína S6K por western Blot.

5.7 Análisis estadístico

Los resultados del peso seco fúngico se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y las medias se compararon mediante las pruebas de LSD con $p < 0.05$.

Para analizar la germinación, se realizó un análisis de supervivencia, adaptado a la germinación con distribución binomial, para evaluar la trayectoria de las curvas de germinación a través del tiempo entre los tratamientos el análisis se dividió por nanopartícula (MWCNTs sintéticos, naturales y NPs de rastrojo).

Para el porcentaje y velocidad de germinación se realizó un análisis de varianza de una vía y una prueba de comparaciones múltiples por medio de LSD, el análisis se dividió por nanopartícula (MWCNTs sintéticos, naturales y NPs de rastrojo).

Los resultados de la longitud de la raíz principal, altura de la planta, biomasa vegetal y la cuantificación de clorofila se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y las medias se compararon mediante las pruebas de LSD con $p < 0.05$, en el software Statistica Six Sigma.

6 RESULTADOS

6.1 Interacción nanopartícula-*Trichoderma* sp.

Para evaluar los efectos de las NPs a base de carbono sobre el crecimiento de *Trichoderma* sp., se evaluó el peso seco fúngico. Los resultados mostraron que las nanopartículas promovieron un aumento de la biomasa fúngica de *Trichoderma* sp. Se registró un aumento significativo de biomasa fúngica en los ensayos tratados con MWCNTs sintéticos a concentración de 10 y 30 $\mu\text{g/mL}$, al igual que con los MWCNTs naturales en concentraciones de 10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$, también en los tratamientos de nanopartículas de rastrojo a concentración de 10, 20, 30 y 40 $\mu\text{g/mL}$ se mostró un aumento significativo en la biomasa fúngica con respecto al control con una media de 8.03 g/L siendo la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ de NPs de rastrojo el mejor tratamiento con una media de 10.99g/L (Fig. 7).

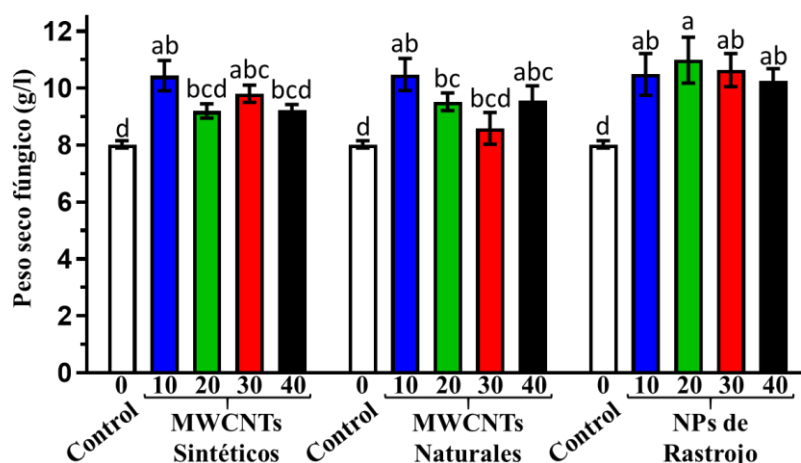


Figura 7. Efecto de nanotubos de carbono y NPs de rastrojo en la biomasa de *Trichoderma* sp. en bioensayo *in vitro* con agitación continua durante 14 días. n=3, los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$, la barra representa el error estándar, letras distintas representan diferencias significativas.

6.2 Caracterización de nanopartículas

Para confirmar la biotransformación de los MWCNTs sintéticos y naturales obtenidos de *Pinus oocarpa* o a base de rastrojo a la exposición de *Trichoderma* sp., las muestras fueron analizadas por los siguientes métodos:

6.2.1 Análisis de nanopartículas por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los resultados obtenidos por FTIR mostraron en MWCNTs sintéticos prístinos los grupos funcionales C-H a 1860 cm^{-1} , OH a 3692 y 2338 cm^{-1} (Fig. 8A). Al estar en contacto con *Trichoderma* sp. se observa la pérdida de estos grupos y se detecta la formación de C-H a 1397 cm^{-1} (Fig. 8B), mientras que en los MWCNTs naturales, se identificó el grupo funcional C-O a 2165 cm^{-1} (Fig. 8C), al comparar esta nanopartícula con el FTIR de los MWCNTs naturales expuesto a *Trichoderma* sp, se observó la pérdida de este grupo funcional, mientras que se generaron otros como C-O a 976 cm^{-1} , C-H a 698 y 1366 cm^{-1} (Fig. 8D). Por el contrario, en las muestras de NPs de rastrojo no se observó la pérdida de algún grupo funcional (Fig. 8E), pero sí se detectaron otros grupos funcionales como C-O a 1122 cm^{-1} , C-H a 2930 cm^{-1} (Fig. 8F).

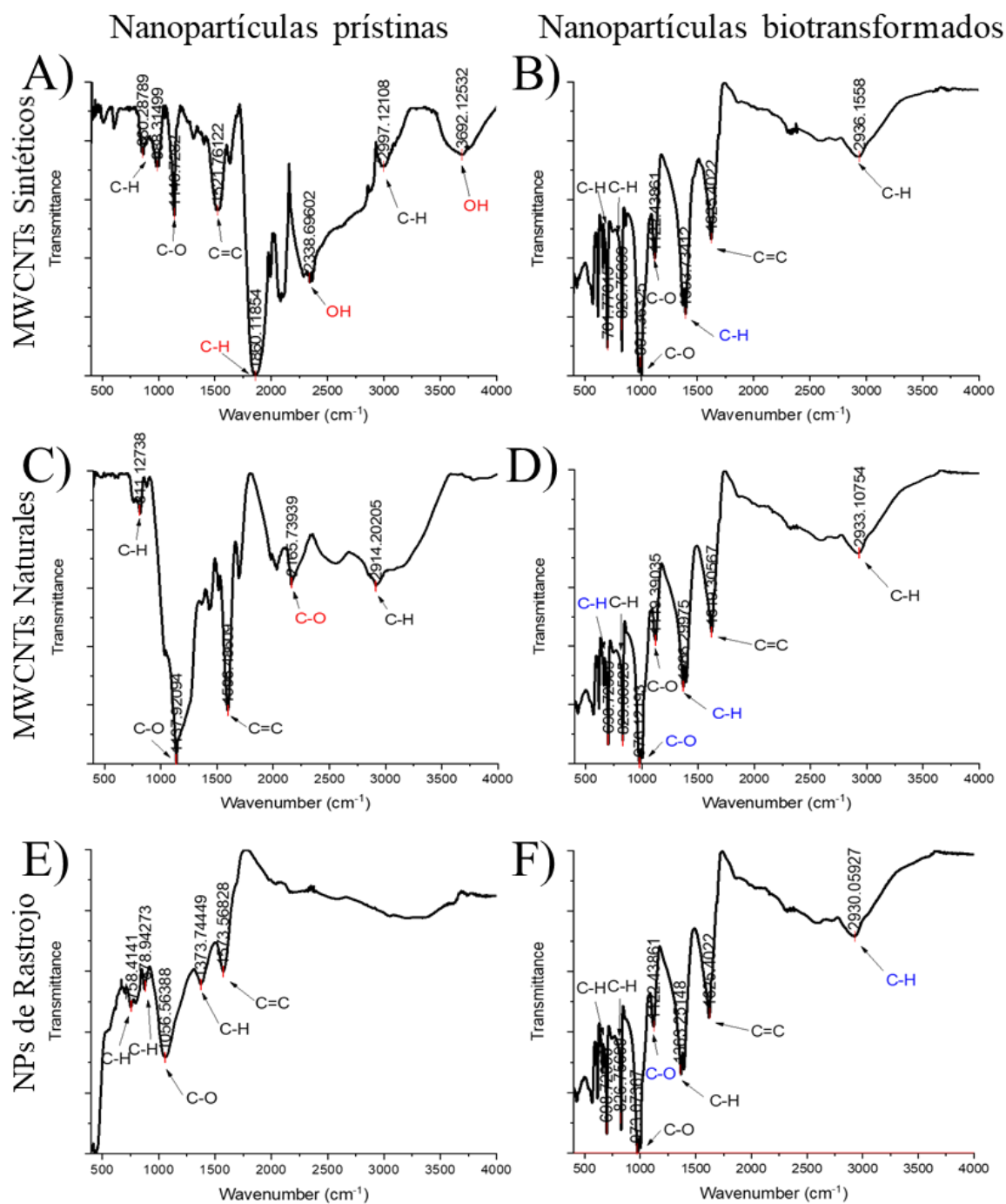


Figura 8. FTIR de nanopartículas de rastreo y MWCNTs naturales y sintéticos con *Trichoderma* sp., en un experimento *in vitro* con agitación continua por 14 días.

6.2.2 Análisis de nanopartículas por Espectroscopía Raman

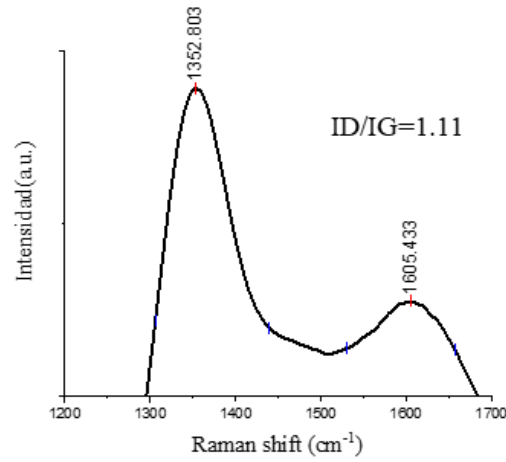
En las figuras 9-11, se muestran los resultados obtenidos por Espectroscopía Raman de los MWCNTs prístinos y las NPs de rastrojo, así como los cambios identificados en estas nanopartículas después de su exposición al crecimiento de *Trichoderma* sp. Los resultados obtenidos mostraron en todos los casos picos característicos de los MWCNTs y del material cristalino de carbono. Se identificaron los picos ~ 1350 y $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ que corresponden a las bandas ID e IG, respectivamente.

Con esto se obtiene la relación ID/IG en los que valores de $ID/IG < 1$ indican que los nanomateriales son más cristalinos o presentan menos defectos en su estructura (Wang et al., 2005). Los valores ID/IG de los MWCNTs mostraron que la interacción de *Trichoderma* sp. con estas nanopartículas disminuyeron la cristalinidad, mostrando una mayor pérdida de cristalinidad donde se adicionó la concentración más baja de MWCNTs, conforme se incrementó la concentración de estas NPs la pérdida de cristalinidad fue menor, sin embargo, en todos los casos se confirmó un efecto de *Trichoderma* sp. sobre estas NPs.

En la figura 9, se muestran los espectros Raman de MWCNTs sintéticos sin biotransformar con un valor de $ID/IG = 1.11$, que al exponerlos a *Trichoderma* sp. en concentraciones de 10, 20, 30 y 40 $\mu\text{g/ml}$, su valor aumenta conforme su concentración disminuye llegando a un valor de $ID/IG = 1.71$. En la figura 10, se observa la misma tendencia con los MWCNTs naturales sin biotransformar con un $ID/IG = 1.25$, en los que también aumenta la pérdida de cristalinidad conforme disminuye la concentración de MWCNTs obteniendo un valor de $ID/IG = 1.76$ a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. Por otro lado, las NPs de rastrojo sin biotransformar obtuvieron un $ID/IG = 1.45$, este se encuentra por encima de los ID/IG de los tratamientos con 20, 30 y 40 $\mu\text{g/ml}$, esto se debe a que la muestra obtenida de NPs de rastrojo es una mezcla de carbón amorfo y NPs cristalinas. El carbón amorfo presente en esta mezcla es susceptible a ser utilizado por *Trichoderma* sp como fuente de nutrientes para su metabolismo. Por este motivo se encuentran valores por encima de las NPs prístinas ya que el hongo en primera instancia utiliza el carbón amorfo, dejando las NPs cristalinas como último recurso (Fig. 11).

NPs no biotrasformadas

MWCNTs Sintéticos



NPs biotrasformadas

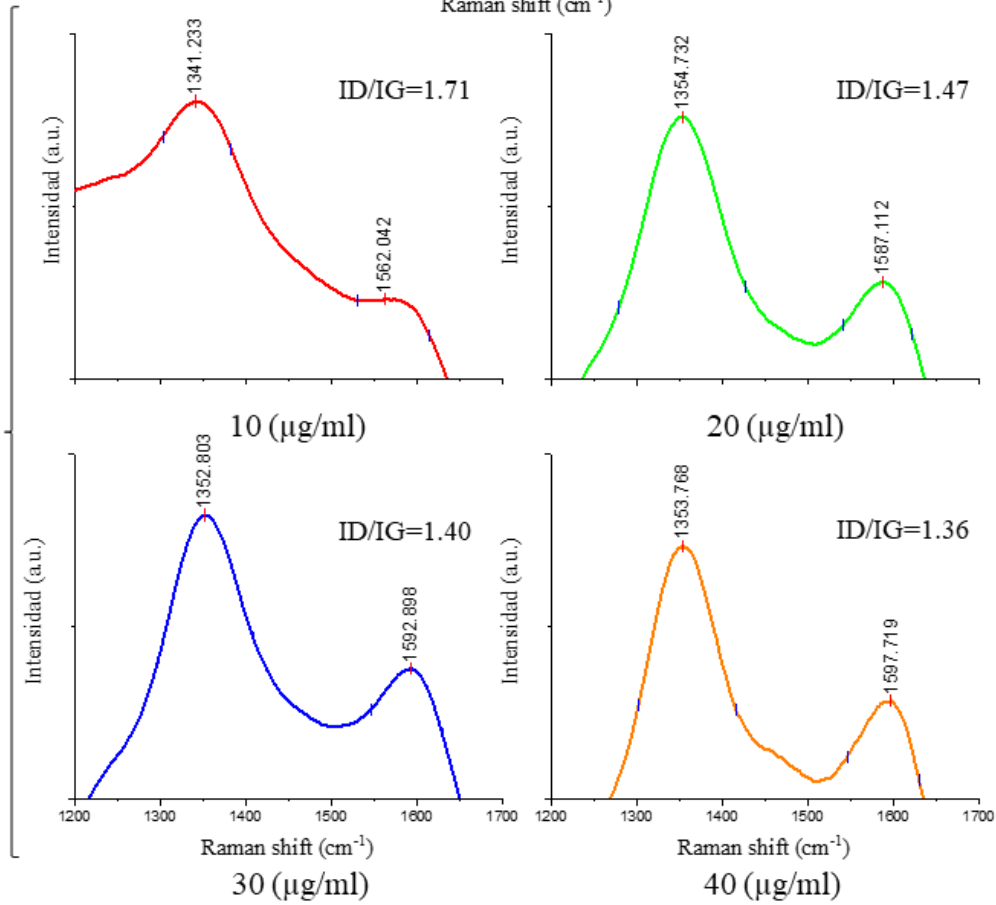
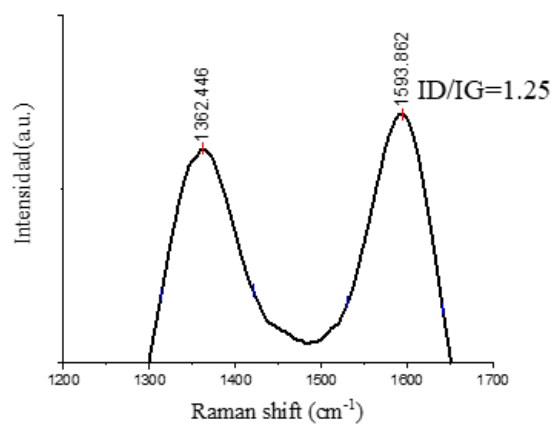


Figura 9. Espectros Raman de MWCNTs sintéticos, con y sin biotransformación con *Trichoderma* sp., en un experimento *in vitro* con agitación continua a 150 rpm/30°C por 14 días.

MWCNTs Naturales

NPs no biotrasformadas



NPs biotrasformadas

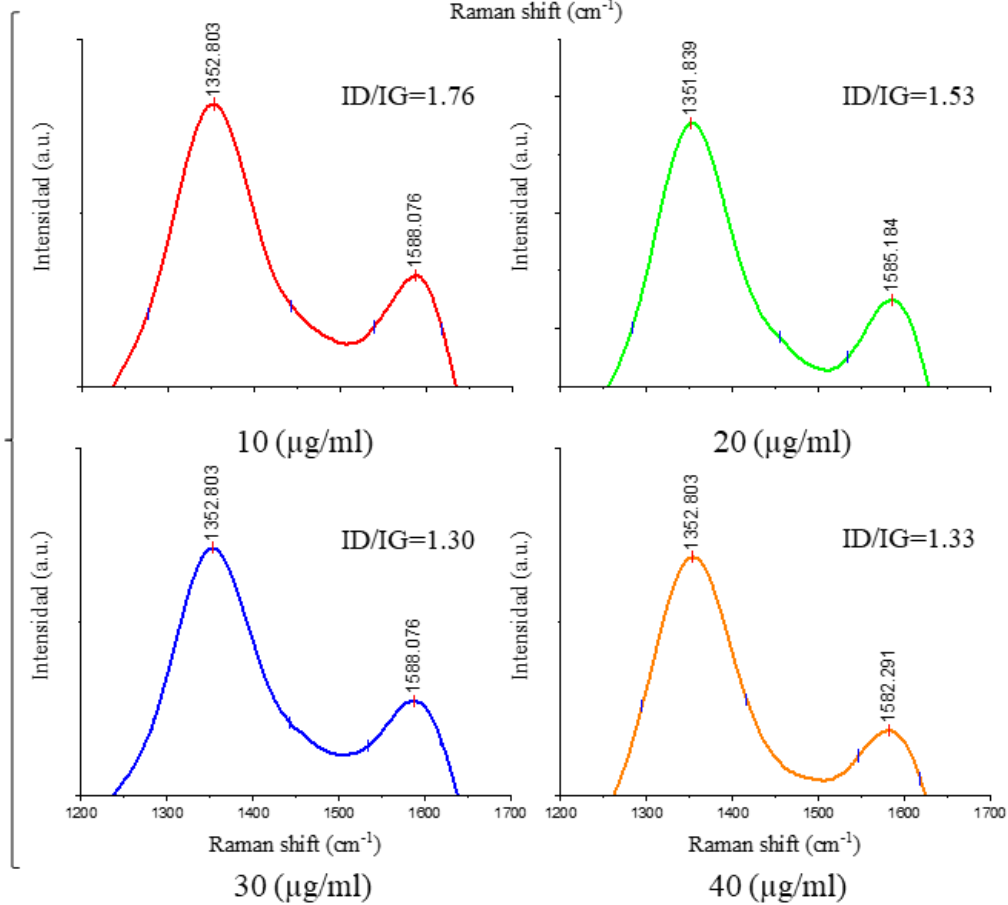
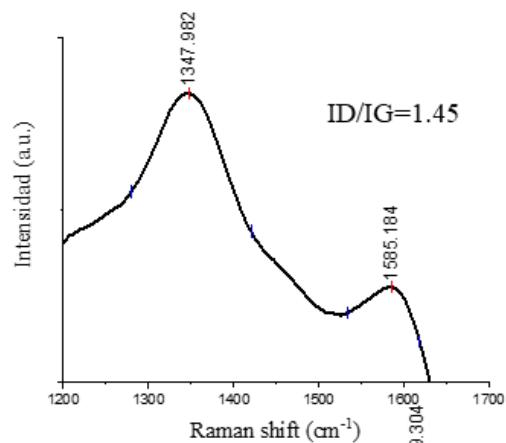


Figura 10. Espectros Raman de MWCNTs naturales, con y sin biotransformación con *Trichoderma* sp., en un experimento *in vitro* con agitación continua a 150 rpm/30°C por 14 días.

NP's no biotrasformadas

NP's de Rastrojo



NP's biotrasformadas

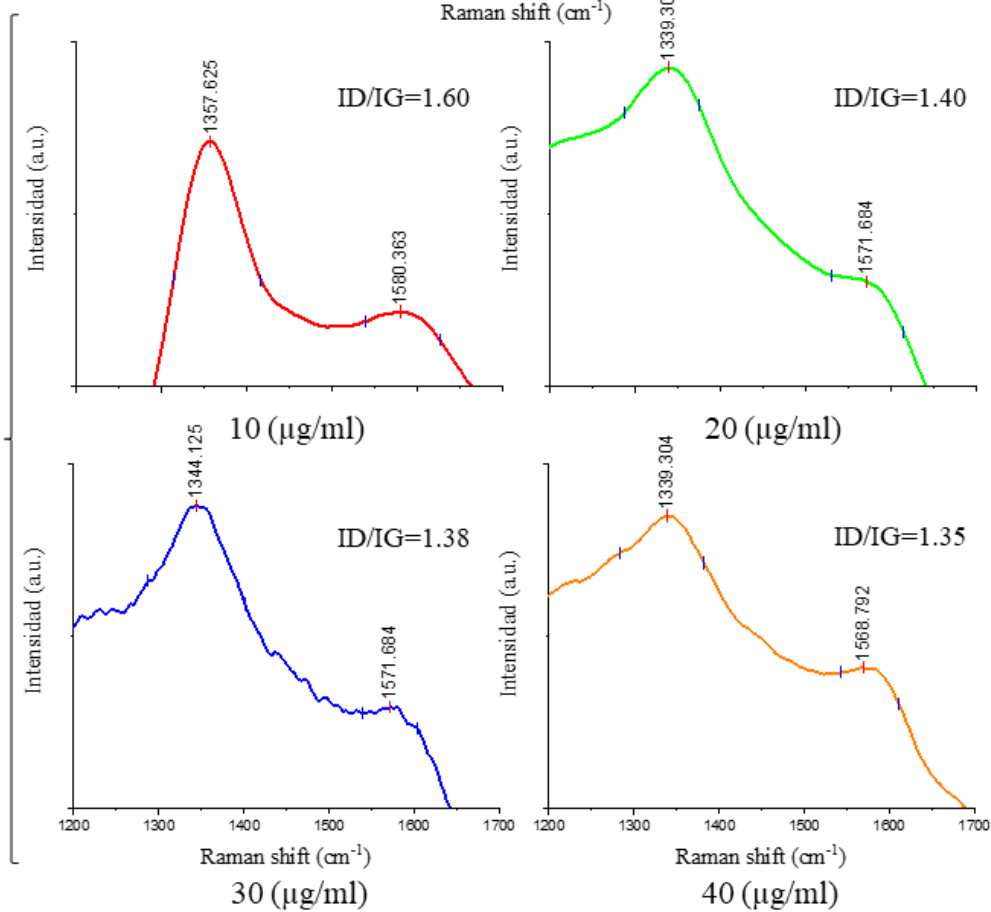


Figura 11. Espectros Raman de NP's de rastrojo, con y sin biotransformación con *Trichoderma* sp., en un experimento *in vitro* con agitación continua a 150 rpm/30°C por 14 días.

6.2.3 Análisis de nanopartículas por microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la figura 12, se muestran las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) que permitieron evaluar los cambios estructurales de la morfología y tamaño de los MWCNTs y nanopartículas de rastrojo al estar expuestos a *Trichoderma* sp. Las imágenes SEM mostraron una clara biotransformación de las nanopartículas. Se observan cambios tanto en la morfología, como en el tamaño de los nanomateriales. Además, diferencias dependientes de la concentración de NPs que se suplementó.

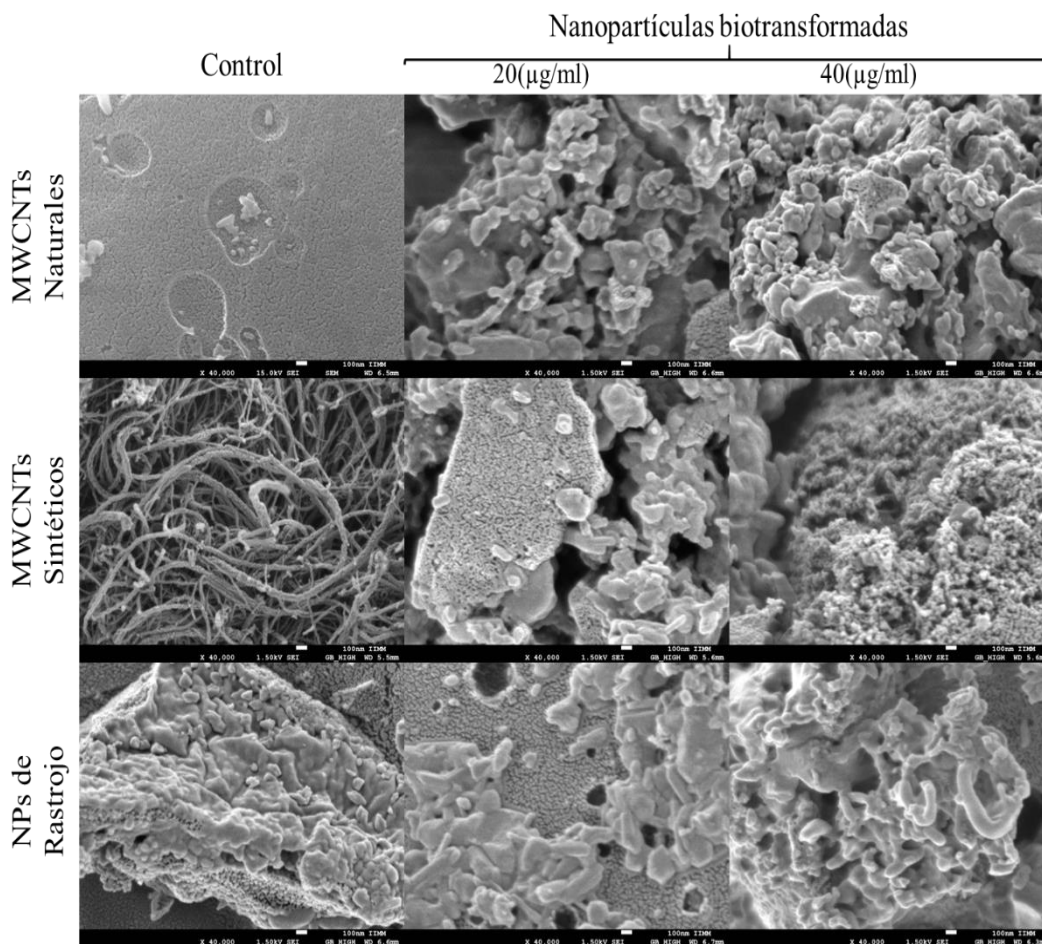


Figura 12. Micrografías SEM de nanopartículas de rastrojo y MWCNTs naturales y sintéticos prístinos y biotransformados con *Trichoderma* sp. Obtenidas a 1.50Kv X10,000, la línea representa escala 1μm.

6.3 Efecto de NPs biotransformadas en la germinación de maíz

Los resultados del análisis de supervivencia adaptado a la germinación con distribución binomial ($X^2 = 3.55$, G.L. 10, $P > 0.05$) para evaluar la trayectoria de la germinación a través del tiempo evaluando las curvas entre los tratamientos de MWCNTs sintéticos con y sin biotransformación, no se encontraron diferencias significativas.

Los resultados de germinación de semillas impregnadas con MWCNTs sintéticos con y sin biotransformación, no mostraron diferencias significativas en la velocidad de germinación, de igual forma, en el porcentaje de germinación a las 30 h tampoco hubo diferencias significativas de los tratamientos de MWCNTs sintéticos al compararlos con el control, en cambio a las 42 h hubo diferencia significativa del porcentaje de germinación en el tratamiento de 40 µg/semilla de MWCNTs sintéticos + extracto fúngico con un 93 %, comparado con el control que fue del 73 % en semillas germinadas (Tabla 2).

Tabla 2. Germinación de maíz cultivado con 0, 10, 20 y 40 µg/semilla de MWCNTs sintéticos con y sin *Trichoderma* sp.

Tratamientos	Disposición de la Nanopartícula	Nanopartículas (µg/semilla)	Germinación de semillas (%) Tiempo después de la siembra			Velocidad de germinación
			30 h	42 h	54 h	
Control	No aplica	0	47 ab	73 bc	97	40.1 a
<i>Trichoderma</i>	No aplica	0	37 b	67 bc	97	42.1 a
MWCNTs Sintéticos	NTC Prístinos	10	47 ab	67 bc	93	41.4 a
		20	47 ab	67 bc	97	40.9 a
		40	40 ab	63 c	100	41.6 a
	NPs Biotransformadas	10	60 a	83 ab	100	37.6 a
		20	37 b	83 ab	97	40.1 a
		40	40 ab	77 abc	97	40.5 a
	Prístinos + Extracto Fúngico	10	53 ab	63 c	93	41.0 a
		20	43 ab	80 abc	97	39.7 a
		40	53 ab	93 a	100	40.8 a

Nota: Los datos se analizaron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$. n=30

Valores en la misma columna con letra diferente representan diferencias significativas.

Para los MWCNTs naturales con y sin biotransformación, los resultados del análisis mostraron diferencia significativa entre los tratamientos ($X^2 = 20.76$, G.L. 10, $P = 0.0027$).

Los resultados de germinación de semillas impregnadas con MWCNTs naturales biotransformados a concentración de 10 µg/semilla mostraron diferencias significativas en la velocidad de germinación en comparación al control, de igual manera, en el porcentaje de germinación a las 30 h también hubo diferencia significativa de este mismo tratamiento con un 77 % se semillas germinadas al compararlo con un 47 % del control, sin embargo, a las 42 h no hubo diferencias significativas en el porcentaje de germinación (Tabla 3).

Tabla 3. Germinación de maíz cultivado con 0, 10, 20 y 40 µg/semilla de MWCNTs naturales con y sin *Trichoderma* sp.

Tratamientos	Disposición de la Nanopartícula	Nanopartículas (µg/semilla)	Germinación de semillas (%) Tiempo después de la siembra			Velocidad de germinación
			30 h	42 h	54 h	
Control	No aplica	0	47 bcd	73 abc	97	40.1 bc
<i>Trichoderma</i>	No aplica	0	37 cd	67 c	97	42.1 c
MWCNTs Naturales	NTC Prístinos	10	37 cd	83 abc	100	39.6 abc
		20	30 d	70 bc	100	42.0 bc
		40	30 d	80 abc	100	40.8 bc
	NTC Biotransformados	10	77 a	90 a	97	34.5 a
		20	67 ab	87 ab	97	36.9 ab
		40	50 bcd	67 c	100	41.2 bc
	NTC Prístinos + Extracto Fúngico	10	43 cd	80 abc	100	39.2 abc
		20	53 bc	87 ab	100	38.4 abc
		40	40 cd	90 a	100	41.2 bc

Nota: Los datos se analizaron con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$. $n=30$

Valores en la misma columna con letra diferente representan diferencias significativas.

Los resultados del análisis mostraron diferencias significativas ($X^2 = 31.41$, G.L. 10, $P=0.0005$) en la trayectoria de la germinación a través del tiempo entre los tratamientos de NPs de rastrojo, con y sin biotransformación.

Los resultados de germinación de semillas impregnadas con NPs de rastrojo + el extracto fúngico a concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ mostraron diferencias significativas en la velocidad de germinación en comparación al control. Por otro lado, en el porcentaje de germinación a las 30 h se encontraron diferencias significativas en los tratamientos de 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de NPs de rastrojo + el extracto fúngico con un 73 % y 80 % de semillas germinadas al igual que el tratamiento de 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de NPs de rastrojo biotransformadas que fueron mayores al control con un 47 %, en cambio en el tratamiento de 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de NPs de rastrojo sin biotransformar se encontró una disminución significativa del porcentaje de germinación con un 20 % en comparación al control. Para lo que fue las 42 h no se encontraron diferencias significativas (Tabla 4).

Tabla 4. Germinación de maíz cultivado con 0, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de NPs de rastrojo con y sin *Trichoderma* sp.

Tratamientos	Disposición de la Nanopartícula	Nanopartículas ($\mu\text{g}/\text{semilla}$)	Germinación de semillas (%) Tiempo después de la siembra			Velocidad de germinación
			30 h	42 h	54 h	
Control	No aplica	0	47 c	73 a	97	40.1 bc
<i>Trichoderma</i>	No aplica	0	37 cd	67 a	97	42.1 c
Nanopartículas de Rastrojo	NPs Prístinas	10	40 cd	83 a	97	39.7 abc
		20	30 cd	87 a	97	40.5 bc
		40	20 d	83 a	97	42.1 c
	Biotransformadas	10	53 bc	77 a	97	38.9 abc
		20	53 bc	73 a	97	39.3 abc
		40	83 a	83 a	93	35.8 ab
	NPs Prístinas + Extracto Fúngico	10	40 cd	67 a	93	42.2 c
		20	73 ab	77 a	100	36.0 ab
		40	80 a	87 a	90	34.2 a

Nota: Los datos se analizaron con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$. $n=30$

Valores en la misma columna con letra diferente representan diferencias significativas.

6.4 Efecto de NPs en el desarrollo de maíz

En la figura 13A se muestran imágenes representativas de la raíz de maíz cultivadas con nanopartículas prístinas, es decir, sin biotransformar por *Trichoderma* sp. suplementadas en concentraciones de 0, 10, 20 y 40 µg/semilla. Estas plántulas se conservaron en casa sombra durante veintiocho días después de la siembra para su desarrollo.

Los resultados sobre la influencia de estas nanopartículas sobre la longitud de la raíz principal se muestra en la figura 13B, en la cual se observa que la adición de NPs sin *Trichoderma* sp. en maíz, en concentraciones de 10 µg/semilla de MWCNTs sintéticos con 24.56 cm fue el tratamiento con el mayor aumento significativo con respecto al obtenido en las plántulas control, con de 8.2 cm, para los tratamientos suplementados con 20 y 40 µg/semilla de MWCNTs sintéticos también se encontró un aumento significativo con respecto al control, de igual forma para las NPs de rastrojo y *Trichoderma* sp por sí solo, obtuvieron resultados similares con aumentos significativos al

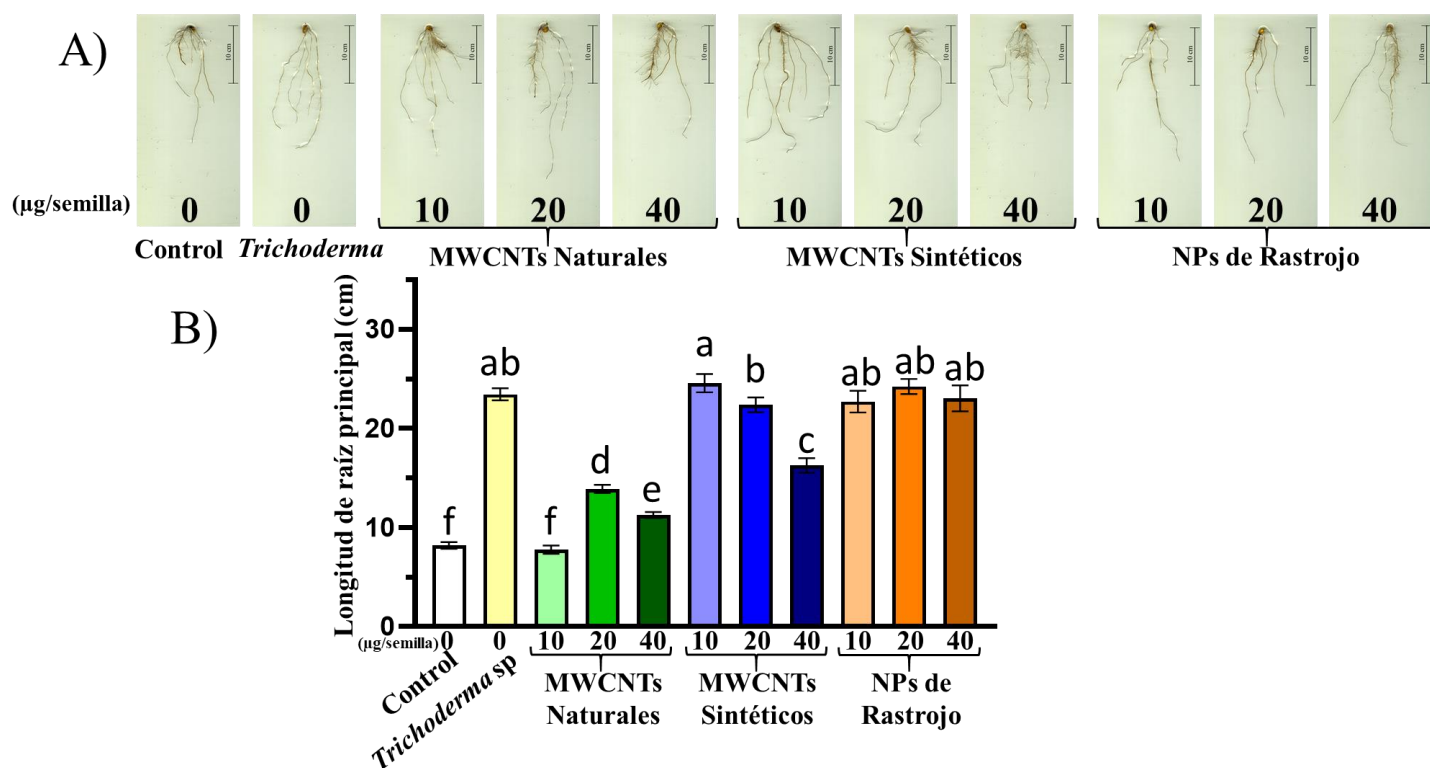


Figura 13. Efecto de nanopartículas sin biotransformación en la raíz, a los 28 días después de la siembra. A) Imágenes representativas de la raíz, la barra de escala representa 10 cm. B) Longitud de la raíz principal.

Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$ la barra representa el error estándar. $n=5$

Letras distintas representan diferencias significativas.

compararlos con el control, para los MWCNTs naturales solo los tratamientos a concentración de 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ generaron un aumento significativo en la longitud de la raíz principal.

En la figura 14A, se muestra el crecimiento de la raíz de maíz cultivadas con nanopartículas biotransformadas por *Trichoderma* sp. suplementadas en concentraciones de 0, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ y conservadas en casa sombra, veintiocho días después de la siembra. Asimismo, en la Figura 14B, se muestra el efecto de estas nanopartículas biotransformadas por *Trichoderma* sp. sobre la longitud de la raíz principal de plántulas de maíz; los resultados mostraron que en concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de MWCNTs naturales se alcanzó una longitud de 28.92 y 29.34 cm fueron los tratamientos con el mayor aumento significativo con respecto al control con una longitud de 8.2 cm, para el tratamiento a concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de MWCNTs naturales también se encontró un aumento significativo con respecto al control, de igual forma para los MWCNTs sintéticos, NPs de rastrojo y *Trichoderma* sp., obtuvieron resultados con aumentos significativos al compararlos con las plantas control.

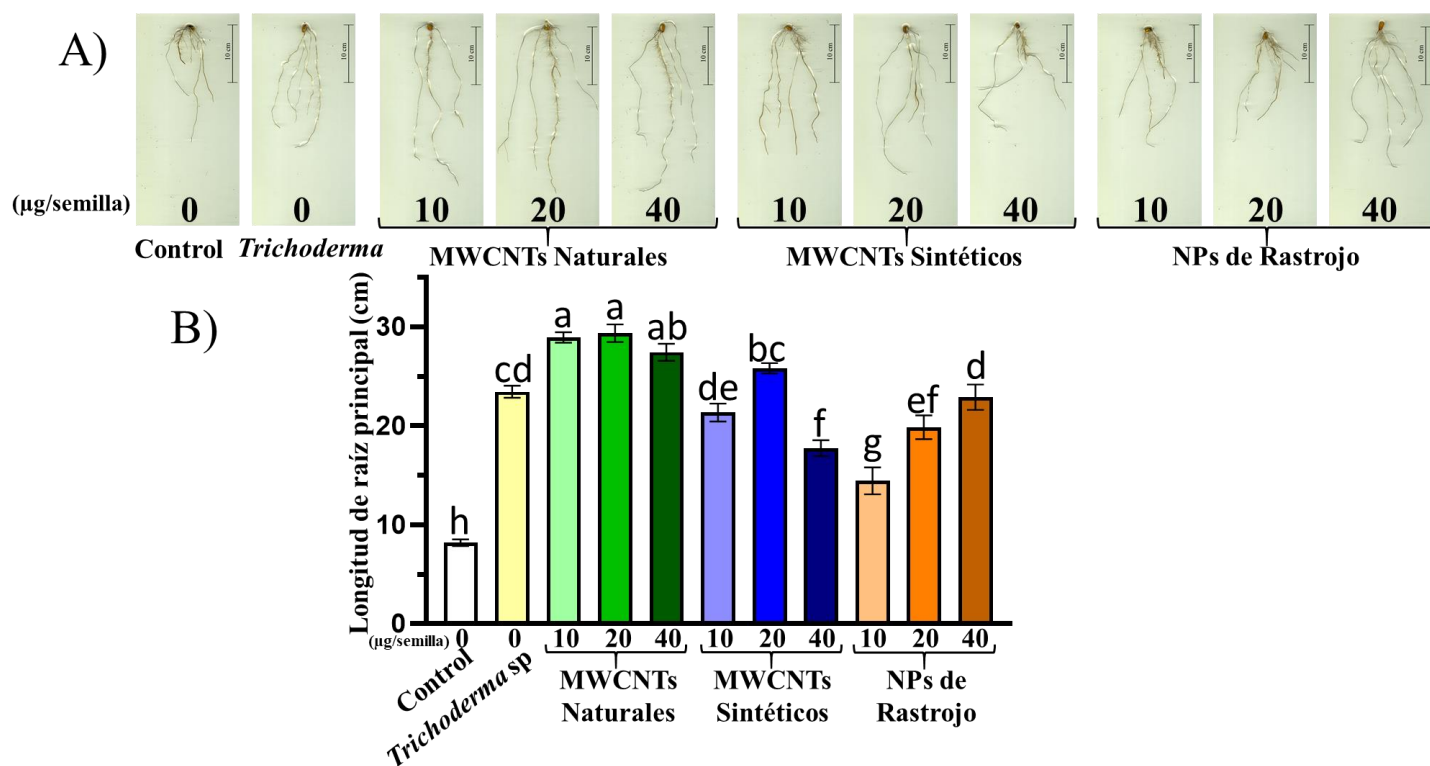


Figura 14. Efecto de nanopartículas biotransformadas en la raíz, a los 28 días después de la siembra. A) Imágenes representativas de la raíz, la barra de escala representa 10 cm. B) Longitud de la raíz principal.

Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$ la barra representa el error estándar. $n=5$

Letras distintas representan diferencias significativas.

En la figura 15A se muestra el crecimiento de la raíz de maíz cultivadas con nanopartículas sin biotransformar+ extracto fúngico suplementadas en concentraciones de 0, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ y conservadas en casa sombra, veintiocho días después de la siembra. Así mismo, en la figura 15B, se muestra el análisis de la longitud de la raíz principal de esta gramínea. Los resultados mostraron que la adición de nanopartículas + extracto fúngico en maíz, en concentraciones de 10 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de MWCNTs sintéticos alcanzaron una longitud de 27.62 cm, siendo el tratamiento con el mayor aumento significativo con respecto a la longitud de la raíz de las plantas control, con una longitud de 8.2 cm, de igual manera con los MWCNTs naturales, NPs de rastrojo y *Trichoderma* sp., obtuvieron resultados con aumentos significativos al compararlos con las plantas control.

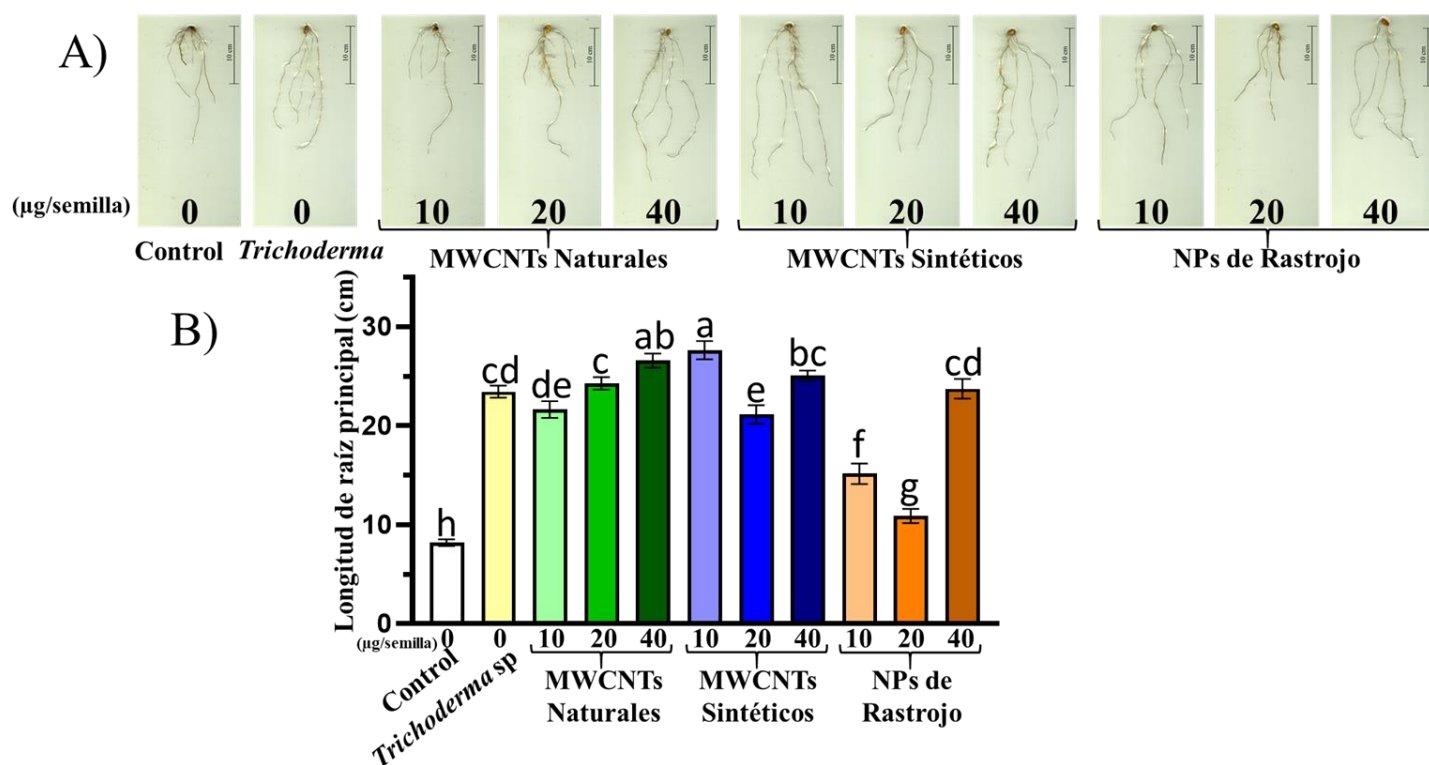


Figura 15. Efecto de nanopartículas sin biotransformar + el extracto fúngico en la raíz, a los 28 días después de la siembra. A) Imágenes representativas de la raíz, la barra de escala representa 10 cm. B) Longitud de la raíz principal.

Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$ la barra representa el error estándar. $n=5$.

Letras distintas representan diferencias significativas.

En la figura 16A, se muestran imágenes representativas del crecimiento de la parte aérea de maíz cultivadas con nanopartículas sin biotransformar por *Trichoderma* sp. conservadas en casa sombra, veintiocho días después de la siembra, mientras que en la figura 16B se muestra la altura que alcanzaron estas plántulas. Se observó que la adición de NPs sin *Trichoderma* sp. en maíz, en concentraciones de 10 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de MWCNTs sintéticos con 22.44 cm de altura, 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de NPs de rastrojo con 22.64 y 21.46 cm y *Trichoderma* sp. con una longitud de 21.38 cm fueron los tratamientos con el mayor aumento significativo con respecto a las plantas control, que tuvo una altura de 17.72 cm, para el tratamiento a concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de MWCNTs sintéticos también se encontró un aumento significativo con respecto al control.

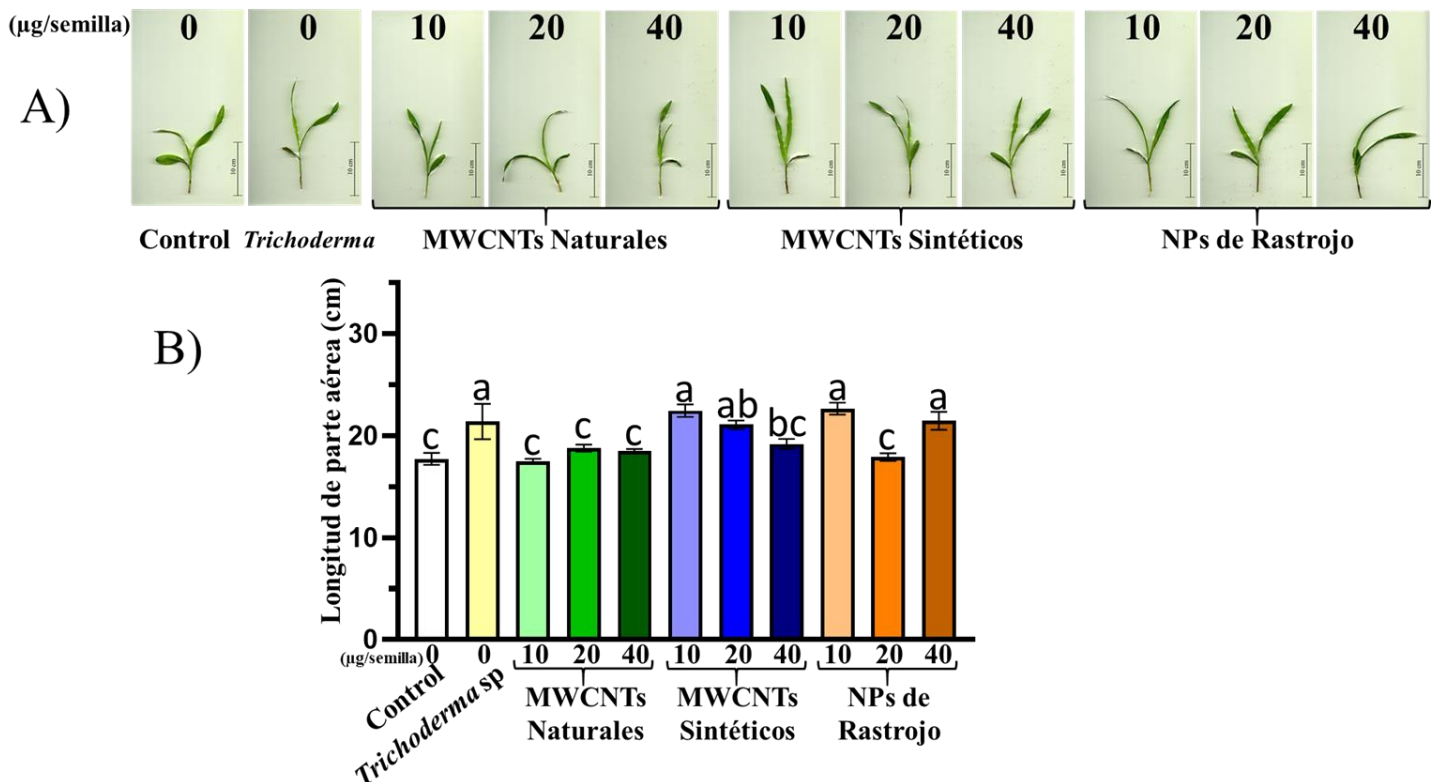


Figura 16. Efecto de nanopartículas sin biotransformación en la parte aérea, a los 28 días después de la siembra. A) Imágenes representativas de la parte aérea, la barra de escala representa 10 cm. B) Longitud de la parte aérea.

Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$ la barra representa el error estándar. $n=5$.

Letras distintas representan diferencias significativas.

En la figura 17A, se muestran imágenes representativas del crecimiento de la parte aérea de maíz cultivadas con nanopartículas biotransformadas por *Trichoderma* sp. suplementadas en concentraciones de 0, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ y conservadas en casa sombra, veintiocho días después de la siembra. Asimismo, se muestra el análisis del crecimiento. Los resultados mostraron que la adición de nanopartículas biotransformadas por *Trichoderma* sp. en maíz, en concentraciones de 20 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de MWCNTs naturales con 30.54 cm, fue el tratamiento con el mayor aumento significativo con respecto a la altura alcanzada por las plantas control, con una longitud de 17.72 cm, para los tratamientos a concentración de 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de MWCNTs naturales también se obtuvo un aumento significativo sobresaliente con respecto al control, con 26.56 y 26.90 cm respectivamente, de igual forma, en los tratamientos de 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de MWCNTs sintéticos, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de NPs de rastrojo y *Trichoderma* sp. se encontró un aumento significativo con respecto a las plantas control (Fig.17B).

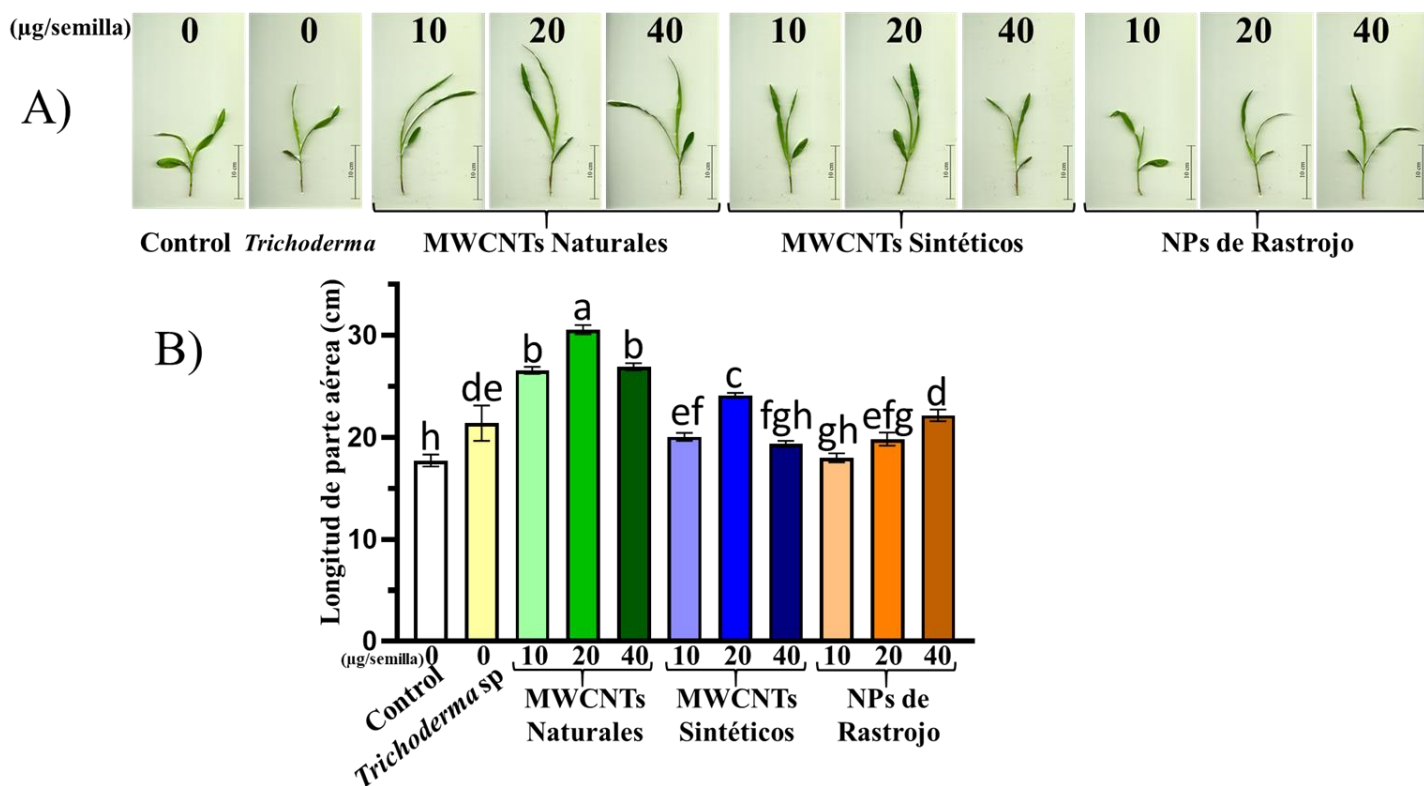


Figura 17. Efecto de nanopartículas biotransformadas en la parte aérea, a los 28 días después de la siembra. A) Imágenes representativas de la parte aérea, la barra de escala representa 10 cm. B) Longitud de la parte aérea.

Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$ la barra representa el error estándar. $n=5$.

Letras distintas representan diferencias significativas.

En la figura 18A, se muestra el crecimiento de la parte aérea de maíz cultivadas con nanopartículas + extracto fúngico conservadas en casa sombra, veintiocho días después de la siembra. Se observó que la adición de nanopartículas + extracto fúngico en maíz, en concentraciones de 20 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de MWCNTs sintéticos con 25.66 cm fue el tratamiento con el mayor aumento significativo con respecto al control con 17.72 cm, para los demás tratamientos de MWCNTs sintéticos, MWCNTs naturales y los tratamientos de 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de NPs de rastrojo y *Trichoderma* sp. se encontró un aumento significativo con respecto a las plantas control (Fig.18B).

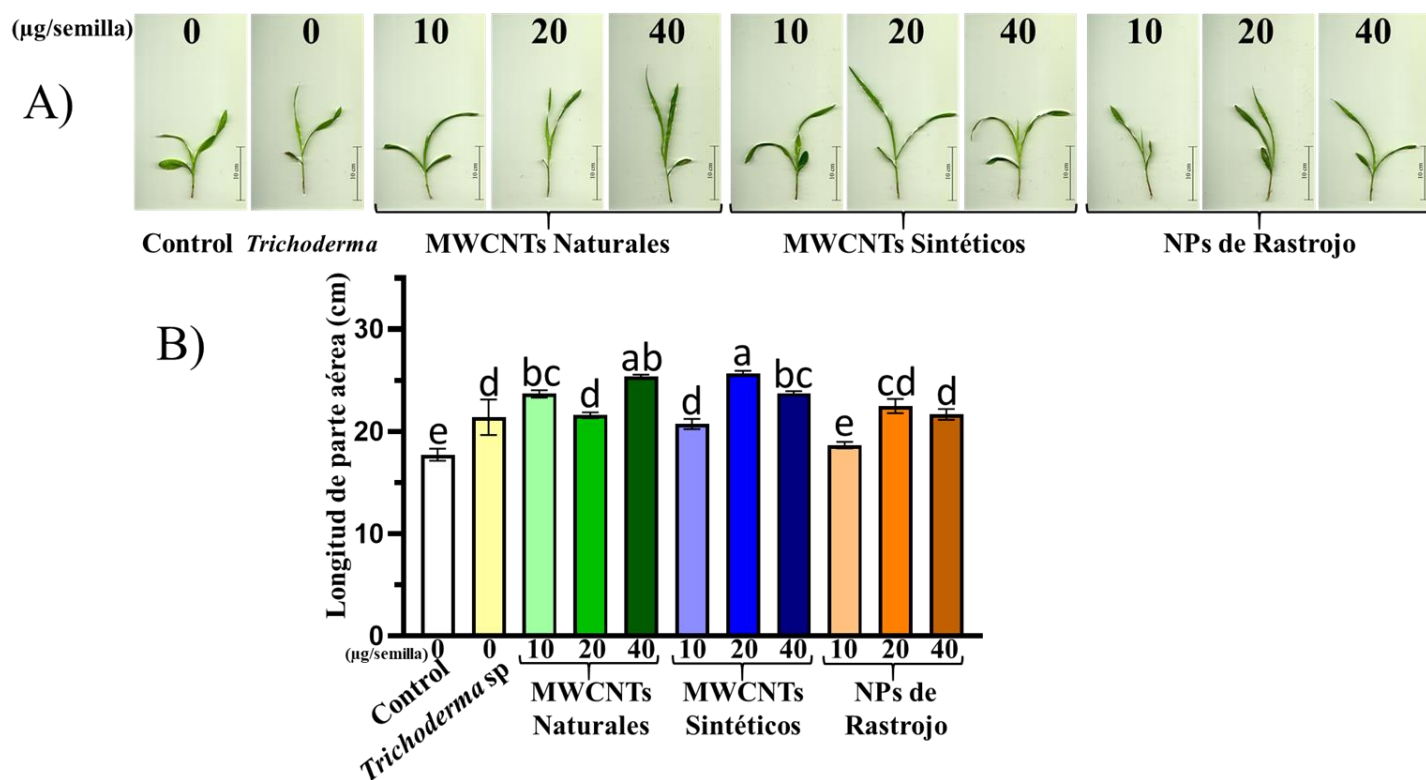


Figura 18. Efecto de nanopartículas sin biotransformar + el extracto fúngico en la parte aérea, a los 28 días después de la siembra. A) Imágenes representativas de la parte aérea, la barra de escala representa 10 cm. B) Longitud de la parte aérea.

Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$ la barra representa el error estándar. $n=5$.

Letras distintas representan diferencias significativas.

6.5 Efecto de NPs biotransformadas en la biomasa de maíz

Se observó que la adición de NPs sin *Trichoderma* sp. y *Trichoderma* sp. en maíz, estimuló el peso fresco, comparado con el control con un peso fresco de 1.01 g, siendo el tratamiento con 20 µg/semilla de MWCNTs sintéticos el que mostró el mayor aumento de peso, con 2.24 g, es decir, más del doble alcanzado en las plantas control (Fig. 19A); mientras que la exposición de estas NPs durante el crecimiento de *Trichoderma* sp. también estimularon el peso fresco a excepción del tratamiento con MWCNTs sintéticos a 40 µg/semilla, que no mostró diferencias significativas a las plantas control, en donde el tratamiento con 40 µg/semilla de NPs de rastrojo con un peso fresco de 2.07 g y MWCNTs naturales a concentración de 20 µg/semilla con 2.06 g, fueron los de mayor aumento con más del doble comparados con el control (Fig. 19B). En cambio, la mezcla de las NPs con micelio fúngico + NPs sin biotransformar, solo se encontró incrementos significativos en el peso fresco de esta gramínea con MWCNTs naturales con sus respectivas concentraciones y los MWCNTs sintéticos con el mayor aumento a concentración de 20 y 40 µg/semilla con un peso fresco de 1.81 y 1.82 g respectivamente (Fig. 19C).

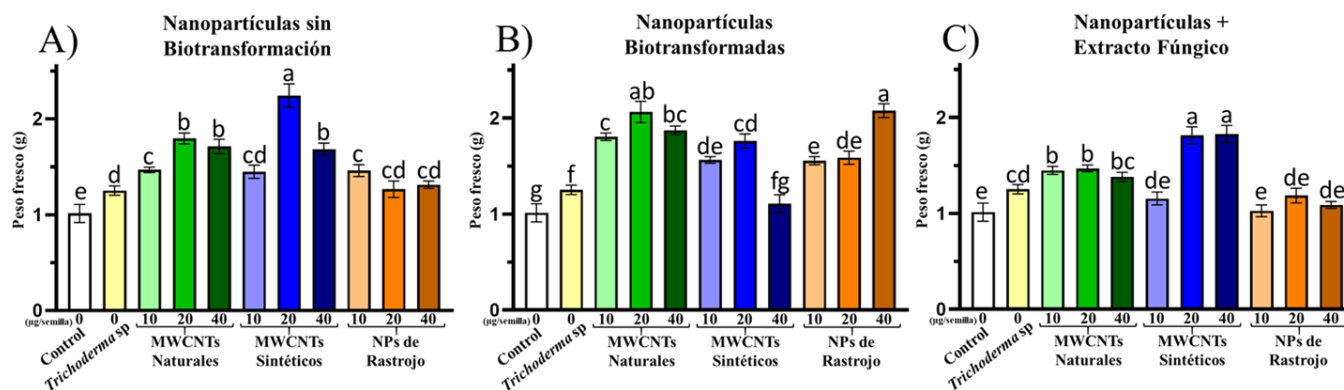


Figura 19. Efecto de nanopartículas biotransformadas en el peso fresco, 28 días después de la siembra. A) Peso fresco de NPs sin biotransformar. B) Peso fresco de NPs biotransformadas. C) Peso fresco de NPs + extracto fúngico.

Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$ la barra representa el error estándar. $n=5$.

Letras distintas representan diferencias significativas.

Por otro lado, se observó que la adición de NPs sin biotransformar en maíz, en los tratamientos de 20 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de MWCNTs sintéticos y naturales se encontró un aumento significativo en el peso seco con valores de 0.23 y 0.22 g respectivamente, en comparación al control con 0.14 g (Fig. 20A); mientras que con las nanopartículas biotransformadas, los tratamientos que estimularon el peso seco fueron los MWCNTs naturales a sus tres concentraciones probadas, siendo la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ la de mayor aumento significativo en peso seco con 0.25 g, junto con el tratamiento de 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de NPs de rastrojo con 0.22 g, también en los tratamientos con MWCNTs sintéticos a concentración de 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ se encontró aumento significativos en la biomasa seca en comparación a las plantas control (Fig. 20B). Finalmente, al mezclar la biomasa fúngica con las nanopartículas en maíz solo se encontró incremento significativo en el peso seco con MWCNTs sintéticos a concentraciones de 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ con una media de 0.17 g comparados con las plantas control (Fig. 20C).

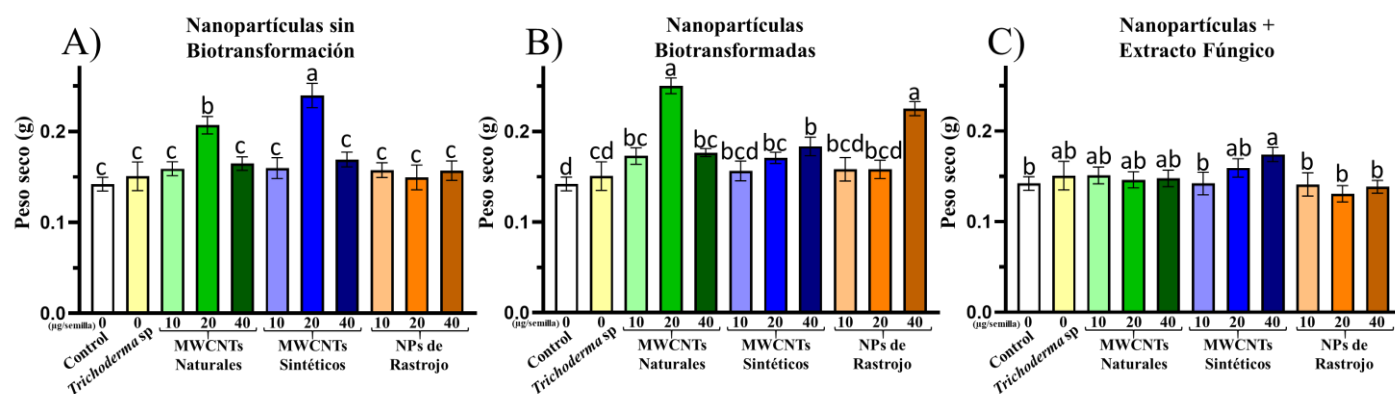


Figura 20. Efecto de nanopartículas biotransformadas en el peso seco, 28 días después de la siembra. A) Peso seco de NPs sin biotransformar. B) Peso seco de NPs biotransformadas. C) Peso seco de NPs + extracto fúngico.

Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$ la barra representa el error estándar. $n=5$.

Letras distintas representan diferencias significativas.

6.6 Efecto de NPs biotransformadas sobre el contenido de clorofilas en maíz

La concentración de clorofila A en los distintos tratamientos de maíz suplementados a 10, 20 y 40 $\mu\text{g/semilla}$ de los nanomateriales a base de carbono se observó un aumento significativo en las NPs sin biotransformar a la concentración de 40 y 20 $\mu\text{g/semilla}$ de MWCNTs naturales y NPs de rastrojo a concentración de 10 y 40 $\mu\text{g/semilla}$, siendo el de 40 $\mu\text{g/semilla}$ el de mayor concentración con una media de 2.10 mg/g de clorofila A en comparación a el control con 0.98 mg/g (Fig. 21A). En las NPs biotransformadas se observó un aumento significativo a las concentraciones de 20 y 40 $\mu\text{g/semilla}$ de MWCNTs naturales en donde el tratamiento de 20 $\mu\text{g/semilla}$ fue el de mayor concentración de clorofila A con 2.22 mg/g, también en las concentraciones de NPs de rastrojo y MWCNTs sintéticos a 20 $\mu\text{g/semilla}$ se encontró un aumento significativo con respecto al control (Fig. 21B). Para las nanopartículas sin biotransformar + el extracto fúngico se observó un aumento significativo en todos los tratamientos con respecto al control, excepto en los MWCNTs sintéticos de 10 $\mu\text{g/semilla}$, siendo los MWCNTs naturales a 20 $\mu\text{g/semilla}$ con la mayor concentración de clorofila A con 1.83 mg/g (Fig. 21C).

Por otro lado, la clorofila B en maíz en los tratamientos suplementados con NPs sin biotransformar solo se observó un aumento significativo con los MWCNTs naturales a concentración de 20 y 40 $\mu\text{g/semilla}$ en donde el de 20 $\mu\text{g/semilla}$ con 0.74 mg/g de clorofila B, siendo el tratamiento de mayor concentración de esta clorofila comparado con el control, donde se obtuvo 0.25 mg/g de clorofila B (Fig. 21D). Mientras que con la adición de NPs biotransformadas se observó un aumento significativo en los tratamientos con MWCNTs naturales en donde el tratamiento de 20 $\mu\text{g/semilla}$ fue el de mayor concentración de clorofila B con 0.87 mg/g, también en los MWCNTs sintéticos a 20 $\mu\text{g/semilla}$ se encontró un aumento significativo con respecto al control (Fig. 21E). En contraste, las nanopartículas sin biotransformar + el extracto fúngico mostró un aumento significativo solo en el tratamiento de 40 $\mu\text{g/semilla}$ de MWCNTs sintéticos con una 0.47 mg/g, al contrario, el tratamiento con 10 $\mu\text{g/semilla}$ de NPs de rastrojo se causó una disminución significativa con 0.16 mg/g de clorofila B (Fig. 21F).

Por lo tanto, en la concentración de clorofila Total para los distintos tratamientos de maíz suplementados a 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de las nanopartículas a base de carbono sin biotransformar, generó un aumento significativo a la concentración de 40 y 20 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de MWCNTs naturales y NPs de rastrojo a concentración de 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ siendo el de 40 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ el de mayor concentración con 2.48 mg/g de clorofila total, en comparación a la del control con 1.33 mg/g (Fig. 21G). Con la adición de las NPs biotransformadas, se observó un aumento significativo en las concentraciones de MWCNTs naturales donde a 20 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ se registró el mayor contenido de

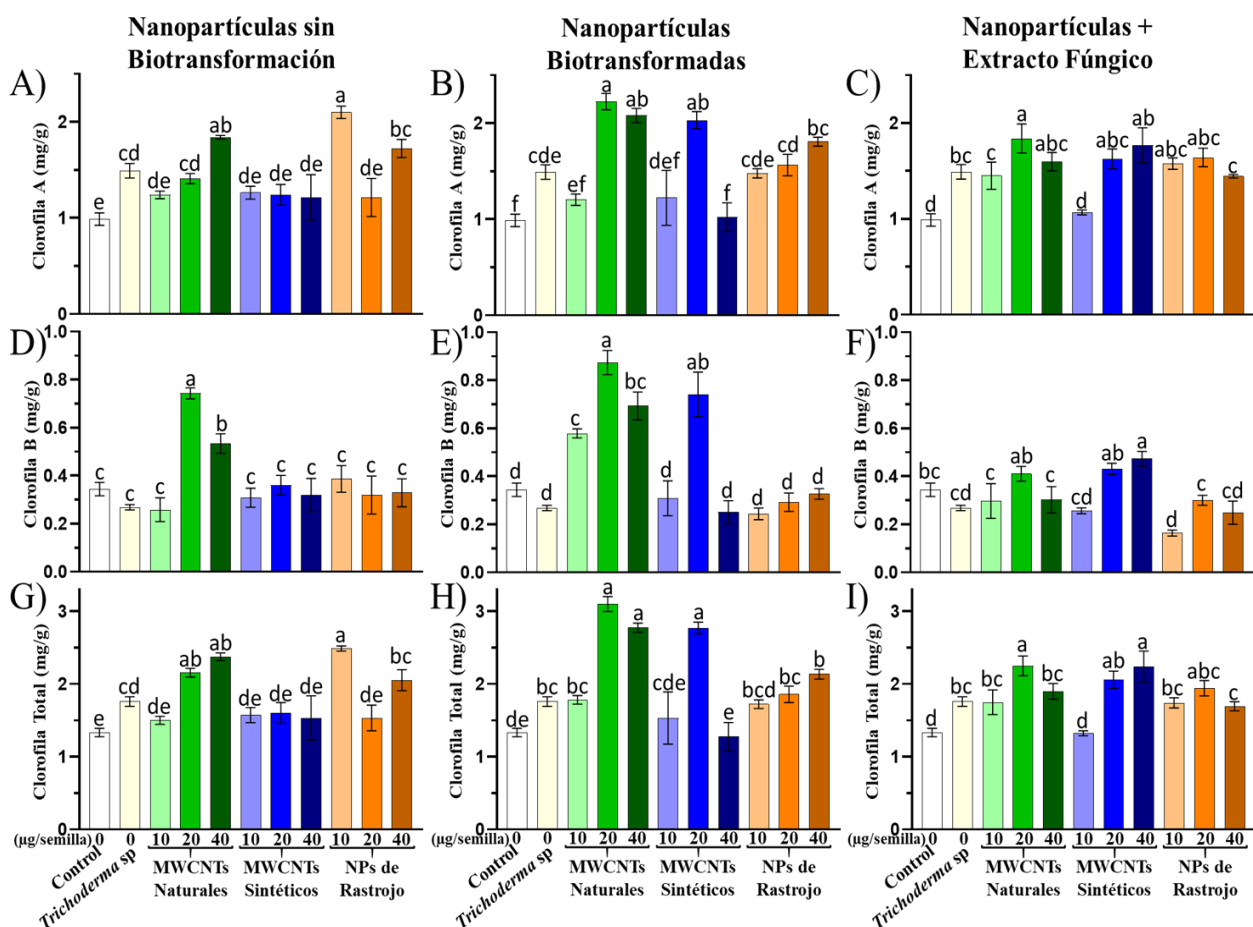


Figura 21. Efecto de nanopartículas biotransformadas en la concentración de clorofila A, B y Total, 21 días después de la siembra. A) Clorofila A de NPs sin biotransformar. B) Clorofila A de NPs biotransformadas. C) Clorofila A de NPs + extracto fúngico. D) Clorofila B de NPs sin biotransformar. E) Clorofila B de NPs biotransformadas. F) Clorofila B de NPs + extracto fúngico. G) Clorofila total de NPs sin biotransformar. H) Clorofila total de NPs biotransformadas. I) Clorofila total de NPs + extracto fúngico.

Los datos fueron analizados con ANOVA-LSD con $p \leq 0.05$ la barra representa el error estándar. $n=3$.

Letras distintas representan diferencias significativas.

clorofila total, con 3.09 mg/g, es decir, con más del doble al compararlo con la clorofila total detectada en las plántulas control, también con la adición de las distintas concentraciones de NPs de rastrojo y MWCNTs sintéticos a 20 µg/semilla se encontró un aumento significativo con respecto al control (Fig. 21H). Finalmente, en las nanopartículas sin biotransformar + el extracto fúngico se observó un aumento significativo en todos los tratamientos con respecto al control, excepto en los MWCNTs sintéticos de 10 µg/semilla, siendo los MWCNTs naturales a 20 µg/semilla con la mayor concentración de clorofila total con 2.24 mg/g (Fig. 21I).

6.7 Efecto de nanopartículas en la vía de señalización TOR-S6K

Para evaluar el efecto de las nanopartículas a base de carbono sobre la activación de la vía TOR se tomaron los ejes embrionarios de maíz a los 3 días de desarrollo. Los resultados obtenidos mostraron que al impregnar las semillas con NPs de rastrojo, MWCNTs sintéticos y naturales (prístinos y biotransformados), suplementadas en concentraciones de 0, 10, 20 y 40 µg/semilla modificaron la actividad de la vía de TOR-S6K, al detectarse una mayor fosforilación de la proteína S6K en distintos tratamientos, comparado con la actividad de esta proteína en el control. También se tiñó la membrana con Rojo de Ponceau para evidenciar la carga homogénea de proteína en el gel (Fig. 22). Se observó un aumento considerable en los tratamientos con MWCNTs naturales biotransformados en la expresión de la S6K fosforilada (Fig. 22 B), de igual forma en lo que fueron los MWCNTs naturales + extracto fúngico a concentración de 10 y 40 µg/semilla (Fig. 22 B y D). y sin biotransformar a concentración de 40 µg/semilla (Fig. 22 B), para lo que fueron los MWCNTs sintéticos no se encontró una diferencia notable en la actividad de la vía (Fig. 22 D y F), sin embargo, se observó una disminución notable en el tratamiento de MWCNTs sintéticos + extracto fúngico a la concentración de 20 µg/semilla (Fig. 22 F), finalmente en las NPs de rastrojo se observó un aumento en la vía TOR-S6K fosforilada en las NPs biotransformadas y NPs + extracto fúngico (Fig. 22 H), al igual que en las NPs sin biotransformar a concentración de 40 µg/semilla (Fig. 22 F).

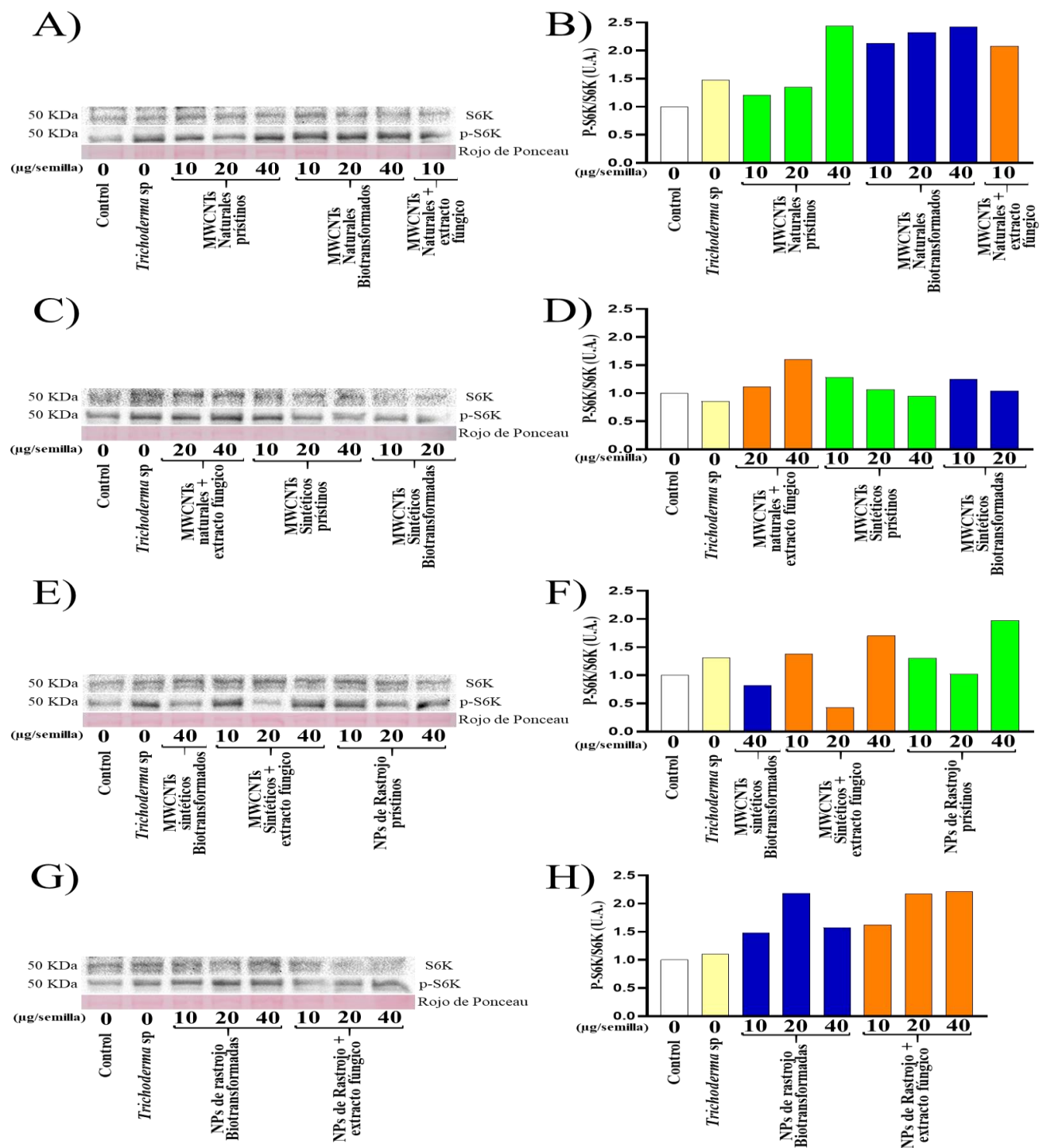


Figura 22. Efecto de nanopartículas biotransformadas sobre la vía de señalización TOR-S6K en maíz. A,C,E y G) Westerns-Blot de las proteínas S6K y S6K fosforilada de ejes embrionarios de 3 días de desarrollo a diferentes concentraciones de NPs de carbono. La membrana se tiño con Rojo de Ponceau como control de carga. B,D,F y H) Densitometría del western blot de la relación de las proteínas S6K sobre S6K fosforilada, a diferentes concentraciones de NPs de carbono.

7 DISCUSIÓN

Se han documentado estudios en los que se evalúa la biotransformación de MWCNTs por acción oxidativa de diversas especies de hongos, en el que las enzimas fúngicas modifican la estructura y composición de las nanopartículas a base de carbono (Lalwani et al., 2014; Zhang et al., 2014; Yang et al., 2018; Ma et al., 2019; Juárez et al., 2021), lo que sugiere que al modificar su estructura y composición, colateralmente modificaran sus propiedades físico-químicas, por lo que los efectos sobre el tejido vegetal serían distintos a los ya documentados para nanopartículas prístinas. Una parte del presente trabajo, fue llevar a cabo la caracterización de los nanomateriales expuestos a la interacción con *Trichoderma* sp., por medio de los análisis FTIR, espectroscopia Raman y microscopía electrónica de barrido, donde se confirmó que las nanopartículas a base de carbono fueron modificadas. Al encontrar defectos estructurales, como reducción en el tamaño de las NPs y modificación de los grupos funcionales presentes. Por ejemplo, en espectroscopia Raman, la banda D que representa el enlace sp^3 del carbono alrededor de los 1350 cm^{-1} muestra los defectos en las capas de grafeno presentes en las nanopartículas a base de carbono, en tanto la banda G representa el enlace sp^2 del carbono alrededor de los 1600 cm^{-1} que corresponde a la cristalinidad del material (Huang et al., 2003). Los análisis de espectroscopia raman (fig. 9-11), mostraron que se produjo una pérdida generalizada de cristalinidad en los materiales, al interaccionar con *Trichoderma* sp., asimismo, se observó que la pérdida de cristalinidad es dependiente de la concentración de NPs, siendo los de más baja concentración los más susceptibles a la oxidación fúngica, de igual forma se encontró la pérdida de cristalinidad con los MWCNTs naturales y las NPs de rastrojo.

Los MWCNTs sintéticos se han utilizado en las últimas décadas, como promotores del crecimiento en distintos sistemas vegetales, con los cuales se han documentado efectos tanto positivos como negativos (Tiwari et al., 2014; Khan et al., 2017; Joshi et al., 2018), en contraste con los MWCNTs naturales, de los cuales hay poca información, sin embargo investigaciones pioneras han documentado que presentan características similares a los MWCNTs sintéticos y en bioensayos comparativos en plantas, en las que se evaluaron los efectos de los dos tipos de nanopartículas, se reportó que las naturales presentan efectos similares o mejores a los MWCNTs sintéticos (Lara et al., 2017; Juárez et al., 2020). Sin embargo, poco se conoce en torno a los efectos de las NPs sintetizadas a partir de rastrojo, utilizadas en este proyecto, en cambio se tiene basta información

de los efectos de nanopartículas a base de grafeno a las que se les atribuyen efectos benéficos en el crecimiento vegetal, pero también efectos fitotóxicos (Anjum et al., 2014). En este trabajo, se presentó los resultados sobre los efectos de las nanopartículas de carbono biotransformadas por *Trichoderma* sp., la nanopartícula por sí sola, la combinación del extracto fúngico y la nanopartícula en bioensayos dosis-respuesta en plantas de maíz.

Nuestros hallazgos mostraron que en semillas germinadas de *Z. mays*, la adición de nanopartículas biotransformadas de MWCNTs naturales a concentración de 10 y 20 µg/semilla, MWCNTs sintéticos a concentración de 10 µg/semilla y NPs de rastrojo a concentración de 40 µg/semilla, se obtuvo un efecto en la emergencia temprana de la semilla al compararla con el control a las 30 h. Por otra parte, en investigaciones recientes documentaron efectos en los que se mejoró y aceleró el proceso de germinación de la semilla en distintos sistemas vegetales, dependientes de las concentraciones agregadas de las nanopartículas utilizadas, al compararlas con las plantas control, por óxido de grafeno en *Vicia faba* L. (Anjum et al., 2014); MWCNTs sintéticos en *Zea mays* L. (Tiwari et al., 2014); MWCNTs sintéticos en *Triticum aestivum* L. (Joshi, et al., 2018); MWCNTs naturales en *Eysenhardtia polystachya* (Júarez et al., 2020). Estos efectos se han atribuido a una mayor captación de agua por las raíces de la planta, en donde se ha documentado la estimulación de la formación de pelos radicales y el engrosamiento radical permitiendo tener una mayor área de superficie disponible para captar agua. En el presente estudio, se detectó la promoción y desarrollo en la raíz principal de maíz, en nanopartículas de los MWCNTs naturales o sintéticos y NPs de rastrojo. La adición de nanopartículas de carbono prístinas a distintas concentraciones, estimularon la longitud de la raíz principal; mientras que la adición de MWCNTs sintéticos o naturales, y NPs de rastrojo biotransformadas estimularon la longitud de la raíz principal durante el crecimiento de *Trichoderma* sp; en tanto la mezcla de MWCNTs naturales y sintéticos con micelio fúngico, tuvo efectos contrastantes en maíz. Diversos autores han documentado efectos similares con el uso de NPs en el desarrollo de la arquitectura radical, lo cual le confiere beneficios a la planta para la absorción de agua, nutrientes, establecimiento de la planta, interacción con microorganismos benéficos, etc, (Joshi, Kaur, Dharamvir et al., 2018; Verma et al., 2019; Rahmani et al., 2020).

Por otra parte, la adición de nanopartículas sin biotransformar + el extracto fúngico, NPs biotransformadas y sin biotransformar a diferentes concentraciones favoreció la longitud de la parte aérea de maíz. Esto sugiere que, la planta se beneficia al tener un área de contacto mayor, para la obtención de agua y nutrientes al interior de la planta (Joshi et al., 2018). Además, las plantas tratadas con las NPs ya mencionadas mostraron un efecto significativo en el peso fresco y seco de la planta de maíz, las nanopartículas de óxido de grafeno al igual que los nanotubos de carbono se están estudiando ampliamente, debido a que se les ha atribuido efectos positivos en la promoción del crecimiento y la producción de biomasa en las plantas (He et al., 2018). Este efecto puede estar asociado a la mayor concentración de clorofila que se está produciendo en las plantas que evaluamos, donde la concentración de clorofila total, en distintos tratamientos con y sin biotransformación y NPs más micelio fúngico, tuvieron aumentos significativos. Resultados similares se han reportado, por ejemplo, Lu et al. (2020), encontró que al acumularse grafeno en las hojas de arroz se intensificó la fluorescencia de los cloroplastos con un aumento de 2.4 veces mayor producción de trifosfato de adenosina con respecto al de los controles. En otro trabajo Joshi et al. (2018), reportaron que los MWCNTs son asimilados por las plantas de *A. sativa* en semilla y raíz, una vez adsorbidos estimularon el desarrollo y crecimiento de la planta, lo cual fue atribuido a que los MWCNTs estimularon la síntesis de clorofila y en consecuencia la función fotosintética.

En condiciones naturales, las nanopartículas están expuestas a microorganismos como hongos, con una capacidad potencial de biodegradarlos y generar efectos colaterales en las plantas nativas. Algunos reportes que han documentado los efectos de nanomateriales biotransformados en sistemas biológicos sugieren que, al biodegradarse los nanomateriales por acción oxidativa de los hongos, estos se pueden hacer más reactivos e inducir estrés oxidativo, ocasionando daños en organismos como los nematodos (Modugno et al., 2016; Vlasova et al., 2016; Chen et al., 2017). Sin embargo, a la fecha, no hay evidencia documental en donde se evalúen los efectos de nanomateriales expuestos a biotransformación y sus posibles efectos en la promoción del crecimiento vegetal. Nuestros resultados mostraron que la adición de NPs biotransformadas por *Trichoderma* sp., estimuló el desarrollo de las plantas de maíz desde etapas tempranas del desarrollo fenológico.

Existen estudios que muestran los efectos negativos de la inhibición de la vía de señalización TOR en los cloroplastos, lo que origina un daño colateral en la fotosíntesis (Dobrenel et al., 2016; Song et al., 2021). Lo anterior sugiere, que una mayor eficiencia fotosintética está asociada a una mayor actividad de la vía de señalización TOR-S6K. No obstante, a la fecha no se cuentan con estudios que evalúen la actividad de la vía TOR, en plantas que hayan sido impregnadas con nanopartículas a base de carbono, por lo que, en este trabajo, se realizó el análisis de esta vía en busca de una posible respuesta al efecto promotor del crecimiento de los MWCNTs sintéticos y naturales, así como las NPs de rastrojo sobre el maíz. Los resultados de nuestro trabajo muestran un incremento en la fosforilación de la S6K en distintos tratamientos, lo que indica una mayor actividad de TOR. Los resultados anteriores concuerdan con investigaciones en mamíferos que documentan que las nanopartículas intervienen en mecanismos que modulan la actividad de mTOR (Lunova et al., 2019), sin embargo, no se tiene claro cómo se vinculan exactamente.

8 CONCLUSIONES

Los hallazgos obtenidos en este trabajo de investigación, demostraron la capacidad de *Trichoderma* sp. para biotransformar las NPs bajo las condiciones experimentales que evaluamos. Donde, además estas NPs, estimularon el desarrollo de este hongo. La biotransformación incluyó cambios en la estructura y características de los nanomateriales a base de carbono. Esta biotransformación modificó e incremento la actividad en sistemas como las plantas, donde contribuyeron a la promoción del crecimiento vegetal, desde estadios de germinación, desarrollo de partes aéreas como subterráneas y la biomasa de *Zea mays* L, al mismo tiempo que estimulan la producción de pigmentos esenciales del desarrollo vegetal como la clorofila. Por otro lado, se está aportando conocimiento nuevo que demuestra que estas nanopartículas biotransformadas participan en la actividad de la vía de señalización TOR-S6K, y tienen una estrecha relación con la actividad fotosintética como mecanismo involucrado en la promoción del desarrollo vegetal.

9 REFERENCIAS

- Andrade, P., Luna, A., Osorio, E., Molina, E., Landero, N., & Hebert, B. (2019). Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1259–1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>
- Anjum, N., Singh, N., Singh, M., Sayeed, I., Duarte, A., Pereira, E., & Ahmad, I. (2014). Science of the Total Environment Single-bilayer graphene oxide sheet impacts and underlying potential mechanism assessment in germinating faba bean (*Vicia faba* L.). *Science of the Total Environment*, The, 472, 834–841. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.018>
- Azcón, J., & Talón, M. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal* (segunda edición). McGrawHill.
- Blankenship, R. E. (2014). Molecular Mechanisms of Photosynthesis. In *Molecular Mechanisms of Photosynthesis* (2nd Edició). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470758472>
- Bouwman, L. et al. Exploring global changes in nitrogen and phosphorus cycles in agriculture induced by livestock production over the 1900-2050 period (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2013) DOI: 10.1073/pnas.1012878108). *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 21196 (2013).
- Charles Molnar; Jane Gair; and Charles Molnar, Jane Gair, *Concepts of biology-H5P 5e*; 2015. En: <https://pressbooks.bccampus.ca/biologyh5p/chapter/5-3-the-calvin-cycle/> Recuperado: November 17, 2022
- Chen, M., Qin, X., & Zeng, G. (2017). Biodegradation of Carbon Nanotubes, Graphene, and Their Derivatives. *Trends in Biotechnology*, 35(9), 836–846. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.12.001>
- Dobrenel, T., Caldana, C., Hanson, J., Robaglia, C., Vincentz, M., Veit, B., & Meyer, C. (2016). TOR Signaling and Nutrient Sensing. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 67, pp. 261–285). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114648>

- Dong, P., Xiong, F., Que, Y., Wang, K., Yu, L., Li, Z., & Ren, M. (2015). Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling
- Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., & Blenis, J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes and Development*, 16(12), 1472–1487. <https://doi.org/10.1101/gad.995802>
- Fu, L., Wang, P., & Xiong, Y. (2020). Target of rapamycin signaling in plant stress responses1[open]. *Plant Physiology*, 182(4), 1613–1623. <https://doi.org/10.1104/PP.19.01214>
- Ghazanfar, M., Raza, M., Raza, W., & Qamar, M. (2018). Trichoderma as potential biocontrol agent, Its exploitation in agriculture: A review. *Plant Protection*, 02(03), 109–135. <http://esciencepress.net/journals/PP>
- Ghorbanpour, M., & Hadian, J. (2015). Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown in vitro. *Carbon*, 94, 749–759. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.07.056>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 48, Issue 12, pp. 909–930). <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gohari, G., Safai, F., Panahirad, S., Akbari, A., Rasouli, F., Dadpour, M. R., & Fotopoulos, V. (2020). Modified multiwall carbon nanotubes display either phytotoxic or growth promoting and stress protecting activity in *Ocimum basilicum* L. in a concentration-dependent manner. *Chemosphere*, 249. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126171>
- González-García, Y., López-Vargas, E. R., Cadenas-Pliego, G., Benavides-Mendoza, A., González-Morales, S., Robledo-Olivo, A., Alpuche-Solís, Á. G., & Juárez-Maldonado, A. (2019). Impact of carbon nanomaterials on the antioxidant system of Tomato seedlings. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235858>
- He, Y., Hu, R., Zhong, Y., Zhao, X., Chen, Q., & Zhu, H. (2018). Graphene oxide as a water transporter promoting. 11(4), 1928–1937.

- Henriques, R., Bögre, L., Horváth, B., & Magyar, Z. (2014). Balancing act: Matching growth with environment by the TOR signalling pathway. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 65, Issue 10, pp. 2691–2701). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru049>
- Huang, J. H., Chuang, C. C., Tsai, C. H., & Chen, W. J. (2003). Excellent field emission from carbon nanotubes grown by microwave-heated chemical vapor deposition. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*, 21(4), 1655. <https://doi.org/10.1116/1.1591750>
- Joshi, A., Kaur, S., Dharamvir, K., Nayyar, H., & Verma, G. (2018). *Multi-walled carbon nanotubes applied through seed-priming influence early germination, root hair, growth and yield of bread wheat (Triticum Aestivum L.) Anjali Joshi*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8818>
- Joshi, A., Kaur, S., Singh, P., Dharamvir, K., Nayyar, H., & Verma, G. (2018). Tracking multi-walled carbon nanotubes inside oat (*Avena sativa* L.) plants and assessing their effect on growth, yield, and mammalian (human) cell viability. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 8(6), 1399–1414. <https://doi.org/10.1007/s13204-018-0801-1>
- Juárez, G., Campos-García, J., Díaz-Pérez, S. P., Lara-Romero, J., Tiwari, D. K., Sánchez-Yáñez, J. M., la Cruz, H. R. de, Jiménez-Sandoval, S., & Villegas, J. (2021). Ligninolytic activity of the *Penicillium chrysogenum* and *Pleurotus ostreatus* fungi involved in the biotransformation of synthetic multi-walled carbon nanotubes modify its toxicity. *PeerJ*, 9. <https://doi.org/10.7717/peerj.11127>
- Juárez, G., Gómez, M., Reyes, H., Campos, J., & Villegas, J. (2020). *Multi-walled carbon nanotubes produced after forest fires improve germination and development of Eysenhardtia polystachya*. 1–13. <https://doi.org/10.7717/peerj.8634>
- Karp G. *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*, 7e; 2017. En: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2036§ionid=153036115> Recuperado: November 17, 2022
- Khan, N., Mobin, M., Abbas, Z., AlMutairi, K., & Siddiqui, Z. (2017). Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 194–209. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.038>

- Khodakovskaya, M. v., Kim, B. S., Kim, J. N., Alimohammadi, M., Dervishi, E., Mustafa, T., & Cernigla, C. E. (2013). Carbon nanotubes as plant growth regulators: Effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. *Small*, 9(1), 115–123. <https://doi.org/10.1002/sml.201201225>
- Kumar, A., Singh, A., Panigrahy, M., Sahoo, P., & Panigrahi, K. (2018). Carbon nanoparticles influence photomorphogenesis and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 37(6), 901–912. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2277-6>
- Lahiani, M., Nima, Z., Villagarcia, H., Biris, A., & Khodakovskaya, M. (2017). Assessment of Effects of the Long-Term Exposure of Agricultural Crops to Carbon Nanotubes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(26), 6654–6662. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01863>
- Lalwani, G., Xing, W., & Sitharaman, B. (2014). Enzymatic degradation of oxidized and reduced graphene nanoribbons by lignin peroxidase. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(37), 6354–6362. <https://doi.org/10.1039/c4tb00976b>
- Lara, J., Campos, J., Dasgupta, N., Borjas, S., Tiwari, D., Paraguay, F., Jiménez, S., Alonso, G., Gómez, M., Lindig, R., de la Cruz, H., & Villegas, J. (2017). Biological effects of carbon nanotubes generated in forest wildfire ecosystems rich in resinous trees on native plants. *PeerJ*, 2017(8), 1–15. <https://doi.org/10.7717/peerj.3658>
- Li, L., Zhu, T., Huang, L., & Ren, M. (2022). Target of Rapamycin Signaling Involved in the Regulation of Photosynthesis and Cellular Metabolism in *Chlorella sorokiniana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7451. <https://doi.org/10.3390/ijms23137451>
- López-Vargas, E. R., González-García, Y., Pérez-Álvarez, M., Cadenas-Pliego, G., González-Morales, S., Benavides-Mendoza, A., Cabrera, R. I., & Juárez-Maldonado, A. (2020). Seed priming with carbon nanomaterials to modify the germination, growth, and antioxidant status of tomato seedlings. *Agronomy*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/agronomy10050639>
- Lu, K., Shen, D., Dong, S., Chen, C., Lin, S., Lu, S., Xing, B., & Mao, L. (2020). Uptake of graphene enhanced the photophosphorylation performed by chloroplasts in rice plants. 12(1).
- Ma, Q., Yilihamu, A., Ming, Z., Yang, S., Shi, M., Ouyang, B., Zhang, Q., Guan, X., & Yang, S. T. (2019). Biotransformation of pristine and oxidized carbon nanotubes by the white rot fungus *phanerochaete chrysosporium*. *Nanomaterials*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nano9091340>

- Mallén, M. J., Perez, M. E., & Crespo, J. L. (2021). Photosynthetic assimilation of CO₂ regulates TOR activity. <https://doi.org/10.1073/pnas.2115261119/-/DCSupplemental>
- Magnuson, B., Ekim, B., & Fingar, D. C. (2012). Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. In *Biochemical Journal* (Vol. 441, Issue 1, pp. 1–21). <https://doi.org/10.1042/BJ20110892>
- McKee T, McKee JR. *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida, 5e*; 2016. En: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1960§ionid=148096471> Recuperado: November 17, 2022
- Modugno, G., Ksar, F., Battigelli, A., Russier, J., Lonchambon, P., Eleto Da Silva, E., Ménard-Moyon, C., Soula, B., Galibert, A. M., Pinault, M., Flahaut, E., Mayne-L'Hermite, M., & Bianco, A. (2016). A comparative study on the enzymatic biodegradability of covalently functionalized double- and multi-walled carbon nanotubes. *Carbon*, 100, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.01.023>
- Muñoz-Ruiz, N. A., Javier Villegas Moreno, H., Kumar-Tiwari, D., Juárez-Cisneros, G., & Borjas-García, S. E. (2023). Effect of Natural Carbon Nanotubes Biotransformed by *Trichoderma* sp. on the Development of *Zea mays*. *Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, 29(1), 44–46. <https://doi.org/10.1093/micmic/ozad067.018>
- Murray, N. (2006). *Introducción a la Botánica*. Person Educacion.
- Nelson, N., & Junge, W. (2015). Structure and energy transfer in photosystems of oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 84(February), 659–683. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-092914-041942>
- Rahmani, N., Radjabian, T., & Soltani, B. M. (2020). Impacts of foliar exposure to multi-walled carbon nanotubes on physiological and molecular traits of *Salvia verticillata* L., as a medicinal plant. *Plant Physiology and Biochemistry*, 150(February), 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.022>
- Park, S., & Ahn, Y. J. (2016). Multi-walled carbon nanotubes and silver nanoparticles differentially affect seed germination, chlorophyll content, and hydrogen peroxide accumulation in carrot (*Daucus carota* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.09.012>

- Perales, H., & Golicher, D. (2014). Mapping the Diversity of Maize Races in Mexico. *PLoS ONE*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone>
- Patlolla, A. K., Berry, A., & Tchounwou, P. B. (2011). Study of hepatotoxicity and oxidative stress in male Swiss-Webster mice exposed to functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 358(1–2), 189–199. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0934-y>
- Pereyra, C. M., Aznar, N. R., Rodriguez, M. S., Salerno, G. L., & Martínez-Noël, G. M. A. (2020). Target of rapamycin signaling is tightly and differently regulated in the plant response under distinct abiotic stresses. *Planta*, 251(1). <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03305-0>
- Pérez, M. E., Couso, I., & Crespo, J. L. (2017). The TOR signaling network in the model unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. In *Biomolecules* (Vol. 7, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom7030054>
- Pisante, M., Stagnari, F. & Grant, C. A. Agricultural innovations for sustainable crop production intensification. *Italian Journal of Agronomy* 7, 300–311 (2012).
- Rodriguez, M., Parola, R., Andreola, S., Pereyra, C., & Martínez-Noël, G. (2019). TOR and SnRK1 signaling pathways in plant response to abiotic stresses: Do they always act according to the “yin-yang” model? In *Plant Science* (Vol. 288). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110220>
- Samadi, S., Saharkhiz, M. J., Azizi, M., Samiei, L., & Ghorbanpour, M. (2020). Multi-walled carbon nanotubes stimulate growth, redox reactions and biosynthesis of antioxidant metabolites in *Thymus daenensis* celak. in vitro. *Chemosphere*, 249. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126069>
- Schepetilnikov, M., Dimitrova, M., Mancera-Martínez, E., Geldreich, A., Keller, M., & Ryabova, L. A. (2013). TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO Journal*, 32(8), 1087–1102. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.61>
- Seixas, A. L. R., Ferreira-Cravo, M., Kalb, A. C., Romano, L. A., Kaufmann, C. G. J. R., & Monserrat, J. M. (2018). Protein oxidation in the fish *Danio rerio* (Cyprinidae) fed with single- and multi-walled carbon nanotubes. *Energy, Ecology and Environment*, 3(2), 95–101. <https://doi.org/10.1007/s40974-017-0080-9>

- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, *Maíz, cultivo en México*; 2023. En: Maíz, cultivo de México | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gob.mx (www.gob.mx) Recuperado: Diciembre 20, 2023
- Smirnova, E., Gusev, A., Zaytseva, O., Sheina, O., Tkachev, A., Kuznetsova, E., Lazareva, E., Onishchenko, G., Feofanov, A., & Kirpichnikov, M. (2012). Uptake and accumulation of multiwalled carbon nanotubes change the morphometric and biochemical characteristics of *Onobrychis arenaria* seedlings. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 6(2), 132–138. <https://doi.org/10.1007/s11705-012-1290-5>
- Song, Y., Alyafei, M. S., Masmoudi, K., Jaleel, A., & Ren, M. (2021). Contributions of tor signaling on photosynthesis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 16). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22168959>
- Steiner, A.A. (1961) A Universal Method for Preparing Nutrient Solutions of a Certain Desired Composition. *Plant and Soil*, 15, 134-154. <https://doi.org/10.1007/BF01347224>
- Strable, J., & Scanlon, M. J. (2009). Maize (*Zea mays*): A model organism for basic and applied research in plant biology. In *Cold Spring Harbor Protocols* (Vol. 4, Issue 10). <https://doi.org/10.1101/pdb.emo132>
- Subramanian, V., Semenzin, E., Hristozov, D., Marcomini, A. & Linkov, I. Sustainable nanotechnology: Defining, measuring and teaching. *Nano Today* 9, 6–9 (2014).
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). FISILOGIA VEGETAL: Vol. Volumen I (Tercera edición). Universitat Jaume. www.sinauer.com
- Tiwari, D., Dasgupta, N., Villaseñor, L., Villegas, J., Carreto, L., & Borjas, S. (2014). Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 4(5), 577–591. <https://doi.org/10.1007/s13204-013-0236-7>
- Upadhyaya, S., & Rao, B. J. (2019). Reciprocal regulation of photosynthesis and mitochondrial respiration by TOR kinase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Direct*, 3(11). <https://doi.org/10.1002/pld3.184>
- Van Leene, J., Han, C., Gadeyne, A., Eeckhout, D., Matthijs, C., Cannoot, B., de Winne, N., Persiau, G., van de Slijke, E., van de Cotte, B., Stes, E., van Bel, M., Storme, V., Impens, F., Gevaert, K., Vandepoele, K.,

- de Smet, I., & de Jaeger, G. (2019). Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. *Nature Plants*, 5(3), 316–327. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0378-z>
- Verma, S. K., Das, A. K., Gantait, S., Kumar, V., & Gurel, E. (2019). Applications of carbon nanomaterials in the plant system: A perspective view on the pros and cons. *Science of the Total Environment*, 667, 485–499. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.409>
- Vlasova, I. I., Kapralov, A. A., Michael, Z. P., Burkert, S. C., Shurin, M. R., Star, A., Shvedova, A. A., & Kagan, V. E. (2016). Enzymatic oxidative biodegradation of nanoparticles: Mechanisms, significance and applications. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 299, 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.01.002>
- Wu, Y., Shi, L., Li, L., Fu, L., Liu, Y., Xiong, Y., & Sheen, J. (2019). *Integration of nutrient, energy, light and hormone signalling via TOR in plants*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz028/5305920>
- Yang, H., Wu, X., Ma, Q., Yilihamu, A., Yang, S., Zhang, Q., Feng, S., & Yang, S. T. (2018). Fungal transformation of graphene by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere*, 216, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.115>
- Ye, L., Zhao, X., Bao, E., Li, J., Zou, Z., & Cao, K. (2020). Bio-organic fertilizer with reduced rates of chemical fertilization improves soil fertility and enhances tomato yield and quality. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56954-2>
- Yin, J., Wang, Y. & Gilbertson, L. M. Opportunities to advance sustainable design of nano-enabled agriculture identified through a literature review. *Environ Sci Nano* 5, 11–26 (2018).
- Zhao, Q., Ma, C., White, J. C., Dhankher, O. P., Zhang, X., Zhang, S., & Xing, B. (2017). Quantitative evaluation of multi-wall carbon nanotube uptake by terrestrial plants. *Carbon*, 114, 661–670. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.12.036>
- Zhang, C., Chen, W., & Alvarez, P. J. J. (2014). Manganese peroxidase degrades pristine but not surface-oxidized (carboxylated) single-walled carbon nanotubes. *Environmental Science and Technology*, 48(14), 7918–7923. <https://doi.org/10.1021/es5011175>