POLIBOTÁNICA

Polibotánica
ISSN electrónico: 2395-9525
polibotanica@gmail.com
Instituto Politécnico Nacional
México
http://www.polibotanica.mx

EFECTO DE NANOTUBOS DE CARBONO SOBRE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE *Agave salmiana* DE DIVERSOS PERÍODOS DE COLECTA

EFFECT OF CARBON NANOTUBE ON THE GERMINATION AND DEVELOPMENT OF *Agave salmiana* OF VARIOUS COLLECTION PERIODS

Gómez-Pelayo, Berenice; García-Nuñez, Hilda Guadalupe; Arzate-Fernández, Amaury Martín; Reyes-Díaz, Jesús Ignacio

EFECTO DE NANOTUBOS DE CARBONO SOBRE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE *Agave salmiana* DE DIVERSOS PERÍODOS DE COLECTA
EFFECT OF CARBON NANOTUBE ON THE GERMINATION AND DEVELOPMENT OF *Agave salmiana* OF VARIOUS COLLECTION PERIODS

POLIBOTÁNICA
Instituto Politécnico Nacional

Núm. **62**: 271-288 México. Julio 2026
DOI: 10.18387/polibotanica.62.18

Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional).

POLIBOTÁNICA

Núm. 62: 271-288 Julio 2026 ISSN electrónico: 2395-9525

Efecto de nanotubos de carbono sobre la germinación y desarrollo de *Agave salmiana* de diversos períodos de colecta

Effect of carbon nanotube on the germination and development of *Agave salmiana* of various collection periods

Gómez-Pelayo, Berenice / https://orcid.org/0009-0003-9544-5079
García-Núñez, Hilda Guadalupe / http://orcid.org/0000-0002-3758-8114
Arzate-Fernández, Amaury Martín / http://orcid.org/0000-0001-8603-0099
Autor de correspondencia: amaury1963@yahoo.com.mx
Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, C.P. 50200 Toluca, México.

Reyes-Díaz, Jesús Ignacio / http://orcid.org/0000-0001-9234-6575
Autor de correspondencia: jird.rd@gmail.com
Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, C.P. 50200 Toluca, México.
Unidad Académica de Capulhuac, Universidad Tecnológica del Valle de Toluca, C. P. 52044 Capulhuac de Mirafuentes, México.

RESUMEN: Los nanotubos de carbono han emergido como nanoestimulantes prometedores para mejorar la germinación y el desarrollo temprano en diversas especies cultivadas, pero su efecto en plantas con metabolismo CAM, particularmente en el género *Agave*, permanece inexplorado. *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck es una especie de gran relevancia ecológica, cultural y económica en México, cuya propagación por semilla enfrenta limitaciones asociadas a la baja germinación y al deterioro progresivo durante el almacenamiento. En este estudio se evaluó el efecto de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) sobre la germinación, el desarrollo inicial y la supervivencia en invernadero de *A. salmiana*, considerando la interacción con el tiempo de almacenamiento de las semillas. Se utilizaron cuatro lotes con diferentes años de colecta (2015, 2016, 2022 y 2024). En una primera fase, semillas del lote más reciente (2024) se expusieron a siete concentraciones de MWCNT (0, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 mg L^{-1}) durante 24 y 48 h para seleccionar dosis representativas. En una segunda fase, las concentraciones seleccionadas (50, 125 y 150 mg L^{-1}) se aplicaron a los cuatro lotes durante 24 h, evaluándose germinación, longitud de hoja y raíz, viabilidad (tetrazolio), morfometría, supervivencia y crecimiento en invernadero. Los resultados mostraron un claro patrón dosis-dependiente: la concentración de 50 mg L^{-1} incrementó significativamente la germinación (hasta 88% en semillas recientes) y estimuló el crecimiento de plántulas, particularmente en longitud radicular. Concentraciones superiores (125–150 mg L^{-1}) generaron respuestas contrastantes, promoviendo el desarrollo radicular en algunos lotes, pero reduciendo la supervivencia en invernadero en otros. El tiempo de almacenamiento resultó crítico: el lote de 2015 presentó germinación y viabilidad casi nulas (<10%), mientras que los lotes de 2022 y 2024 alcanzaron porcentajes de germinación cercanos al 90% y supervivencia en invernadero superior al 85%. Sorprendentemente, el lote de 2024, a pesar de presentar las semillas de mayor tamaño y peso, mostró baja viabilidad en la prueba de tetrazolio (14.7%), indicando que la morfometría no es un predictor fiable de la calidad fisiológica. En conjunto, estos resultados demuestran que los MWCNT pueden actuar como bioestimulantes efectivos en *A. salmiana* cuando se aplican en concentraciones moderadas (50 mg L^{-1}) sobre semillas con calidad fisiológica adecuada (<3 años de

Gómez-Pelayo, Berenice; García-Nuñez, Hilda Guadalupe; Arzate-Fernández, Amaury Martín; Reyes-Díaz, Jesús Ignacio

EFECTO DE NANOTUBOS DE CARBONO SOBRE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE *Agave salmiana* DE DIVERSOS PERÍODOS DE COLECTA

EFFECT OF CARBON NANOTUBE ON THE GERMINATION AND DEVELOPMENT OF *Agave salmiana* OF VARIOUS COLLECTION PERIODS

POLIBOTÁNICA
Instituto Politécnico Nacional

Núm. 62: 271-288. Juli 2026

DOI: 10.18387/polibotanica.62.18

almacenamiento), pero su efecto se ve anulado o se torna inhibitorio en lotes con deterioro avanzado o con dosis elevadas. Este estudio proporciona la primera evidencia sobre nano-bio-interacciones en agaves y establece bases metodológicas para incorporar nanotecnología en programas de propagación y conservación de germoplasma de especies con metabolismo CAM.
Palabras clave: *Agave salmiana*, germinación, tiempo de almacenamiento, nanoestimulantes.

ABSTRACT: Carbon nanotubes have emerged as promising nanostimulants to enhance germination and early development in various cultivated species, but their effect on plants with CAM metabolism, particularly in the genus *Agave*, remains unexplored. *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck is a species of great ecological, cultural, and economic relevance in Mexico, whose seed propagation faces limitations associated with low germination and progressive deterioration during storage. This study evaluated the effect of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) on germination, early development, and greenhouse survival of *A. salmiana*, considering the interaction with seed storage time. Four seed lots with different collection years (2015, 2016, 2022, and 2024) were used. In the first phase, seeds from the most recent lot (2024) were exposed to seven MWCNT concentrations (0, 25, 50, 75, 100, 125, and 150 mg L^{-1}) for 24 and 48 h to select representative doses. In a second phase, the selected concentrations (50, 125, and 150 mg L^{-1}) were applied to all four lots for 24 h, evaluating germination, leaf and root length, viability (tetrazolium test), seed morphometry, survival, and greenhouse growth. Results showed a clear dose-dependent pattern: the 50 mg L^{-1} concentration significantly increased germination (up to 88% in recent seeds) and stimulated seedling growth, particularly in root length. Higher concentrations (125–150 mg L^{-1}) generated contrasting responses, promoting root development in some lots but reducing greenhouse survival in others. Storage time proved critical: the 2015 lot showed nearly null germination and viability (<10%), while the 2022 and 2024 lots achieved germination percentages close to 90% and greenhouse survival above 85%. Surprisingly, the 2024 lot, despite having the largest and heaviest seeds, showed low viability in the tetrazolium test (14.7%), indicating that morphometry is not a reliable predictor of physiological quality. Together, these results demonstrate that MWCNT can act as effective biostimulants in *A. salmiana* when applied at moderate concentrations (50 mg L^{-1}) to seeds with adequate physiological quality (<3 years of storage), but their effect is nullified or becomes inhibitory in lots with advanced deterioration or at high doses. This study provides the first evidence of nano-bio-interactions in agaves and establishes methodological bases for incorporating nanotechnology into propagation and germplasm conservation programs for species with CAM metabolism.
Key words: *Agave salmiana*, germination, storage time, nanostimulants,

INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Agave*, conocidas comúnmente como magueyes, han sido fundamentales para las sociedades de Mesoamérica desde hace aproximadamente 10,000 años (Gentry, 2004; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2009). Este género, endémico del continente americano, comprende más de 200 especies, de las cuales México es centro de origen y diversificación con aproximadamente el 75% de ellas (García-Mendoza, 2002). Entre estas, *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck destaca por su importancia cultural, ecológica y económica, siendo utilizada tradicionalmente para la producción de bebidas fermentadas (pulque), obtención de fibras (ixtle), forraje y, más recientemente, para la producción de bioenergéticos y compuestos de interés industrial (Álvarez-Duarte *et al.*, 2018; Servin *et al.*, 2015).

El ciclo de vida de *A. salmiana*, característico de una especie semélpara, puede extenderse entre 15 y 25 años, iniciando con la germinación de la semilla y culminando con una única fase reproductiva que produce entre 250 y 350 semillas por fruto (García-Mendoza, 2002; Ramírez-Tobías & Peña-Valdivia, s/f). Sin embargo, solo una fracción mínima de estas semillas logra germinar y establecerse en condiciones silvestres debido a múltiples factores limitantes: escasez de humedad edáfica, depredación por herbívoros, incidencia de patógenos y competencia con

especies vegetales establecidas (Aguirre-Dugua & Eguiarte, 2013). Esta baja eficiencia en el reclutamiento natural representa un cuello de botella crítico para la conservación de las poblaciones silvestres y para el establecimiento de cultivos comerciales.

Las semillas que no germinan inmediatamente después de su dispersión pueden permanecer viables en el banco de suelo por períodos variables, o bien deteriorarse progresivamente cuando las condiciones ambientales no son favorables (Bewley *et al.*, 2013). El deterioro fisiológico durante el almacenamiento se manifiesta en pérdida de viabilidad, reducción del vigor y disminución de la capacidad germinativa, atributos que determinan el potencial de establecimiento y el rendimiento posterior de las plántulas (Ellis & Roberts, 1980; Hampton, 2002). La longevidad de las semillas depende de una compleja interacción entre factores intrínsecos, como la composición genética, el contenido de humedad y el estado de madurez al momento de la cosecha, y factores extrínsecos, principalmente la temperatura y la humedad relativa durante el almacenamiento (ISTA, 2023; Walters *et al.*, 2005). En este contexto, la evaluación de la calidad fisiológica mediante pruebas estandarizadas de viabilidad (tetrazolio) y germinación resulta fundamental para predecir el comportamiento de los lotes de semillas y optimizar su uso en programas de propagación y conservación (Velázquez Reyes & Ruíz Torres, 2014).

Paralelamente, en las últimas dos décadas, la nanotecnología ha emergido como una herramienta innovadora con aplicaciones crecientes en el sector agrícola. La agro-nanotecnología se define como la disciplina dedicada a la producción y aplicación de nanopartículas (NPs) y nanoelementos para desarrollar productos y tecnologías de nueva generación que mejoren la eficiencia de los insumos agrícolas, reduzcan el impacto ambiental y aumenten la productividad (Servin, 2015). Dentro del amplio espectro de nanomateriales, los nanotubos de carbono (NTC) han captado especial atención debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas: elevada relación superficie/volumen, conductividad eléctrica, resistencia mecánica y capacidad para interactuar con membranas biológicas y estructuras celulares (Torres-García *et al.*, 2019; Khodakovskaya *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2016).

La primera evidencia documentada del efecto positivo de los nanotubos de carbono en plantas cultivadas fue reportada por Khodakovskaya *et al.* (2009), quienes demostraron que soluciones de riego con NTC de pared múltiple (MWCNT) en concentraciones de 10 a 40 mg L^{-1} podían penetrar la testa de semillas de tomate, incrementando significativamente las tasas de germinación y estimulando el crecimiento de plántulas jóvenes. Este efecto promotor fue atribuido a la capacidad de los MWCNT para facilitar la imbibición mediante la creación de poros o canales en la cubierta seminal, así como a la activación de genes clave involucrados en la división celular, la expansión de la pared celular y el transporte de agua (acuaporinas) (Khodakovskaya *et al.*, 2011, 2012). Estudios posteriores reforzaron estos hallazgos en un espectro diverso de especies: la aplicación de concentraciones adecuadas de MWCNT estimuló el crecimiento radicular en *Brassica juncea* (Ghodake *et al.*, 2010), promovió la elongación de raíces en cebolla y pepino (Cañas *et al.*, 2008), mejoró la germinación y el vigor en trigo y maíz (Lahiani *et al.*, 2017), e incrementó el rendimiento de frutos en tomate bajo condiciones de invernadero (Khodakovskaya *et al.*, 2013).

Sin embargo, la literatura también ha documentado que los efectos de los MWCNT son estrictamente dosis-dependientes y pueden transitar de bioestimulantes a fitotóxicos cuando se supera un umbral crítico de concentración (Villagarcia *et al.*, 2012). Este comportamiento hormético ha sido asociado con la inducción de estrés oxidativo por acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), peroxidación lipídica y daño a membranas celulares a dosis elevadas (Begum & Fugetsu, 2012; Ghodake *et al.*, 2010; R. Wang *et al.*, 2017). La ventana óptima de concentración parece variar entre especies, órganos y condiciones experimentales, lo que subraya la necesidad de establecer protocolos específicos para cada sistema biológico de interés.

A pesar de los avances documentados en modelos agrícolas convencionales, la aplicación de nanotubos de carbono en especies de importancia ecológica, cultural y económica como los agaves permanece prácticamente inexplorada. Considerando los desafíos asociados a la germinación natural de *Agave salmiana* (baja eficiencia de reclutamiento, pérdida progresiva de viabilidad durante el almacenamiento y limitada capacidad de establecimiento en condiciones adversas), resulta fundamental evaluar si los MWCNT pueden actuar como nanoestimulantes que

mejoren el desempeño germinativo y el desarrollo temprano de esta especie. Adicionalmente, es necesario comprender cómo interactúan dos factores críticos: (i) la concentración de los MWCNT y (ii) el estado fisiológico basal de las semillas (determinado por su tiempo de almacenamiento), ya que ambos podrían modular la dirección y magnitud de la respuesta, determinando si los nanotubos actúan como promotores del crecimiento o como agentes de estrés.

Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivos: (1) evaluar el efecto de diferentes concentraciones de MWCNT (0–150 mg L^{-1}) y tiempos de imbibición (24 y 48 h) sobre la germinación y el desarrollo inicial de *A. salmiana* en un lote de semillas reciente; (2) seleccionar concentraciones representativas (baja, media y alta) para analizar su interacción con el tiempo de almacenamiento en lotes de cuatro años distintos (2015, 2016, 2022 y 2024); y (3) determinar si los MWCNT pueden mitigar parcialmente los efectos del deterioro asociado al almacenamiento prolongado, mejorando la supervivencia y el crecimiento en invernadero. Los resultados de esta investigación buscan contribuir al desarrollo de protocolos nanotecnológicos para la propagación y conservación de germoplasma de agaves, así como al conocimiento fundamental sobre nano-bio-interacciones en plantas con metabolismo CAM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron semillas de *A. salmiana* provenientes de cuatro lotes con diferentes años de colecta (2015, 2016, 2022 y 2024). Las colectas se realizaron de manera independiente en cada año señalado, en poblaciones silvestres del Estado de México, México. Todo el material fue almacenado bajo condiciones controladas de 4 a 6 °C, en completa oscuridad y con silica gel como desecante, dentro de contenedores herméticos en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas (Universidad Autónoma del Estado de México, UAEMex). Estas condiciones se mantuvieron para minimizar el deterioro fisiológico previo a las evaluaciones.

Nanomateriales de carbono

El nanomaterial empleado correspondió a nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT, por sus siglas en inglés) con una pureza del 95 % y un diámetro de 10-30 nm (número de catálogo: 773840, Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EE. UU.). Este material se utilizó en todas las soluciones experimentales preparadas para las fases I y II.

Caracterización inicial de los lotes de semillas

Morfometría de semillas

Se evaluaron las variables morfométricas: longitud, ancho y grosor (mm), así como peso (mg). Las dimensiones lineales se registraron con un vernier digital (Truper, CALDI-6MP, Jilotepec, México), mientras que el peso se determinó en una balanza analítica (Sartorius, ENTRIS224-1S, Gotinga, Alemania). Para cada lote se analizaron 100 semillas, distribuidas en cuatro repeticiones de 25 semillas como unidad de observación. Los resultados se expresaron como la media ± error estándar.

Viabilidad: prueba de tetrazolio

La viabilidad fisiológica se determinó mediante la prueba de tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio) al 1%, siguiendo las normas vigentes de la ISTA (Asociación Internacional de Pruebas de Semillas). Se utilizaron 100 semillas por lote, con cuatro repeticiones de 25 semillas. Cada semilla se perforó lateralmente con un punzón evitando dañar el embrión. Posteriormente, las semillas se colocaron en frascos de vidrio ámbar con la solución de tetrazolio al 1%, se cubrieron con papel aluminio y se incubaron a 25 °C durante 72 h en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, los embriones se extrajeron cuidadosamente con pinzas y bisturí y se colocaron en cajas de Petri para su evaluación bajo un microscopio estereoscópico (BOECO,

NST-606, Alemania). Se consideraron como viables aquellas semillas cuyo embrión presentó una coloración roja o rosada intensa y homogénea, mientras que las semillas con embrión sin teñir o con tejidos no teñidos se clasificaron como no viables. Adicionalmente, se registró el número de semillas que carecían físicamente de embrión, expresando este valor como porcentaje del total de semillas analizadas por lote.

Desinfección de semillas

La desinfección se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por (Alvarez-Aragón *et al.*, 2020). En total, se desinfectaron 800 semillas para la Fase I y 800 para la Fase II, que posteriormente se utilizaron en los tratamientos correspondientes. Brevemente, las semillas se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante 2 minutos, seguido de una inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2% (v/v) con dos gotas de Tween 20 durante 10 minutos en agitación constante. Finalmente, se realizaron cinco enjuagues con agua destilada estéril para eliminar residuos del desinfectante.

Diseño experimental general

El estudio se desarrolló en dos fases experimentales secuenciales. En la Fase I se evaluó el efecto de siete concentraciones de MWCNT y dos tiempos de imbibición sobre la germinación y desarrollo inicial del lote de semillas más reciente (2024), con el objetivo de seleccionar concentraciones representativas. En la Fase II se evaluaron las concentraciones seleccionadas en los cuatro lotes con diferente tiempo de almacenamiento (2015, 2016, 2022 y 2024), utilizando el tiempo de imbibición que mostró los efectos más pronunciados en la fase previa.

Preparación de soluciones con nanotubos de carbono

Fase I. Efecto de MWCNT en germinación y desarrollo inicial (lote 2024)

Se evaluaron siete concentraciones de MWCNT: 0 (testigo), 25, 50, 75, 100, 125 y 150 mg L^{-1}. Las cantidades requeridas se pesaron en una balanza analítica (Sartorius, ENTRIS224-1S, Gotinga, Alemania), se colocaron en tubos Falcon de 50 mL y se aforaron a 50 mL con agua destilada. Cada solución se sometió a sonicación durante 15 min a 130 W de potencia en un sonicador ultrasónico (Sonics, VCX-130PB, Newtown, Connecticut, EE. UU.) para favorecer la dispersión homogénea del nanomaterial.

Las semillas desinfectadas del lote 2024 se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL (10 semillas por tubo) y se agregó 1 mL de cada una de las soluciones preparadas. Cada concentración se manejó con cinco repeticiones, totalizando 50 semillas por tratamiento. Los tubos se colocaron en frascos de vidrio protegidos con papel aluminio y se mantuvieron en un agitador orbital (Lab Companion, OS-100, Daejeon, Corea del Sur) a 200 rpm durante 24 y 48 h para evaluar el efecto del tiempo de imbibición.

Fase II. Efecto de MWCNT según el tiempo de almacenamiento (lotes 2015, 2016, 2022 y 2024)

Con base en los resultados de la Fase I (Tabla 1), se seleccionaron tres concentraciones de MWCNT que representaron diferentes tipos de respuesta: 50 mg L^{-1} (efecto promotor consistente), 125 mg L^{-1} (efecto intermedio) y 150 mg L^{-1} (efecto contrastante). Se incluyó además el tratamiento testigo (0 mg L^{-1}). El tiempo de imbibición seleccionado fue de 24 h, por ser el que mostró los efectos más pronunciados sobre el crecimiento de plántulas en la Fase I.

La preparación de las soluciones y la exposición de las semillas siguió el protocolo descrito en la Fase I, aplicándose de manera independiente a cada uno de los cuatro lotes de semillas (2015, 2016, 2022 y 2024). Para cada lote y concentración se utilizaron cinco repeticiones de 10 semillas, totalizando 50 semillas por tratamiento por lote.

Germinación y desarrollo en condiciones controladas
Tras la exposición a los MWCNT, las semillas se transfirieron a cajas Petri de 90 mm de diámetro (cinco por tratamiento), colocando 10 semillas por caja sobre papel filtro Whatman No. 1 previamente hidratado con 3 mL de agua destilada estéril. El experimento se mantuvo durante 28 días en una cuarto de incubación a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad. Se hidrató cada caja cada tercer día con 1 mL de agua destilada estéril y se registraron los eventos de germinación diariamente, considerando como germinada la semilla que presentó una radícula de al menos 2 mm de longitud.

Porcentaje de germinación
El porcentaje final de germinación se determinó mediante el conteo total de semillas germinadas por tratamiento y por lote al día 28, expresándose como porcentaje respecto al total de semillas evaluadas.

Medición de plántulas a los 28 días
A los 28 días después de la siembra, se midió la longitud de la raíz principal y de la hoja más larga (mm) en todas las plántulas germinadas, utilizando un vernier digital (Truper, CALDI-6MP, Jilotepec, México). Estos datos permitieron evaluar el efecto del nanomaterial en el desarrollo inicial de las plántulas.

Adaptación en invernadero
Las plántulas obtenidas de cada tratamiento se trasplantaron a charolas de germinación de 200 cavidades (con un volumen de 30 mL por cavidad) con espuma fenólica estéril a 121 °C durante 20 min. Se trasladaron a condiciones de invernadero (temperatura promedio de 28 °C y humedad relativa del 60 ± 10%), donde permanecieron durante dos meses para su aclimatación, con riegos cada tercer día mediante microaspersión. El porcentaje de supervivencia se calculó al final del período mediante la fórmula: (Número de plántulas vivas / Número de plántulas trasplantadas) × 100.

Morfometría de plántulas adaptadas
Después de 2 meses en invernadero, se registraron las variables morfológicas de las plántulas sobrevivientes: longitud de la hoja más larga y longitud de la raíz principal (mm), utilizando un vernier digital (Truper, CALDI-6MP, Jilotepec, México). El lote 2015 no se incluyó en este análisis por la nula supervivencia de sus plántulas.

Análisis estadístico
Los datos obtenidos fueron sometidos a pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (Levene) para verificar los supuestos de parametricidad. Para determinar el efecto de los tratamientos con MWCNT y el año de colecta (lote) sobre las variables evaluadas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, incluyendo la interacción entre ambos factores. En los casos donde los datos no cumplieron los supuestos paramétricos, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Cuando se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$), se realizó una prueba de comparación de medias *post hoc* de Tukey. Todos los análisis se ejecutaron utilizando el software estadístico R (versión 4.3.1, R Core Team, 2023). Los resultados se presentan como la media ± error estándar, y las diferencias significativas se indican mediante letras distintas (Tukey, $p < 0.05$).

RESULTADOS

Fase I. Lote 2024: Selección de concentraciones de MWCNT
Con el objetivo de identificar concentraciones representativas (baja, media y alta) de MWCNT para evaluar en lotes con diferente tiempo de almacenamiento, se realizó un primer experimento utilizando semillas del lote más reciente (2024). Se evaluaron siete concentraciones (0, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 mg L^{-1}) y dos tiempos de imbibición (24 y 48 h). La Tabla 1 resume el efecto de estos tratamientos sobre la germinación, el desarrollo inicial y la supervivencia en invernadero.

Tabla 1. Efecto de la concentración de MWCNT y el tiempo de imbibición sobre la germinación y el desarrollo inicial de *Agave salmiana* (lote 2024).
Table 1. Effect of MWCNT concentration and imbibition time on germination and early development of *Agave salmiana* (2024 seed lot).

Concentración (mg L^{-1})	Tiempo (h)	Germinación (%)	Longitud de hoja (mm)	Longitud de raíz (mm)	Supervivencia en invernadero (%)
0 (Testigo)	24	72.0 ± 2.0 bc	19.4 ± 0.9 cd	7.0 ± 0.4 c	95.0 ± 2.9 a
	48	70.0 ± 3.2 bc	13.9 ± 0.6 e	5.3 ± 0.5 cd	78.0 ± 3.7 bcd
25	24	78.0 ± 2.0 ab	18.6 ± 0.8 cd	6.3 ± 0.4 cd	84.0 ± 2.4 abc
	48	80.0 ± 3.2 ab	12.8 ± 0.5 e	2.9 ± 0.3 e	70.0 ± 4.5 cd
50	24	88.0 ± 3.7 a	29.2 ± 1.2 a	13.6 ± 0.9 a	94.0 ± 2.4 a
	48	86.0 ± 2.4 a	16.1 ± 0.7 de	4.6 ± 0.4 d	90.0 ± 3.2 ab
75	24	84.0 ± 2.4 ab	17.1 ± 0.8 cde	5.7 ± 0.4 cd	82.0 ± 3.7 abc
	48	66.0 ± 4.0 c	16.5 ± 0.7 cde	4.8 ± 0.4 d	78.0 ± 3.7 bcd
100	24	66.0 ± 4.0 c	17.8 ± 0.8 cde	7.3 ± 0.5 c	82.0 ± 3.7 abc
	48	86.0 ± 2.4 a	15.5 ± 0.7 de	3.7 ± 0.3 de	91.0 ± 3.3 ab
125	24	78.0 ± 3.7 ab	26.5 ± 1.1 ab	8.1 ± 0.5 bc	85.0 ± 2.9 abc
	48	82.0 ± 2.0 ab	18.7 ± 0.8 cd	11.5 ± 0.9 ab	97.0 ± 2.0 a
150	24	82.0 ± 2.0 ab	26.5 ± 1.1 ab	8.1 ± 0.5 bc	91.0 ± 2.4 ab
	48	76.0 ± 2.4 b	19.9 ± 0.8 bc	6.2 ± 0.5 cd	68.0 ± 4.9 d

Los valores representan la media ± error estándar (n=5 repeticiones de 10 semillas cada una). Medias con la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$).

Los resultados mostraron un comportamiento diferencial dependiente de la concentración y el tiempo de exposición. La concentración de 50 mg L^{-1} con 24 h de imbibición destacó significativamente ($p < 0.05$) sobre el resto de los tratamientos, registrando los valores más altos en germinación (88%), longitud de hoja (29.2 mm) y longitud de raíz (13.6 mm). Este efecto promotor fue consistente también a 48 h de exposición, aunque con menor magnitud en el crecimiento de plántulas.

Las concentraciones de 125 y 150 mg L^{-1} mostraron efectos positivos, particularmente en el desarrollo radicular a 48 h, donde se observaron longitudes de raíz de 11.5 mm y 6.2 mm, respectivamente. Sin embargo, estos valores fueron inferiores a los alcanzados con 50 mg L^{-1}. En contraste, concentraciones intermedias como 75 y 100 mg L^{-1} mostraron comportamientos erráticos, con disminuciones en la germinación a 48 h (66% en ambos casos) y un crecimiento de plántulas por debajo del testigo en algunas variables.

En cuanto a la supervivencia en invernadero, todos los tratamientos mantuvieron porcentajes superiores al 68%, siendo particularmente altos (>90%) en los tratamientos con 50 mg L^{-1} (24 h), 100 mg L^{-1} (48 h) y 125 mg L^{-1} (48 h). El valor más bajo (68%) se registró en la concentración de 150 mg L^{-1} a 48 h.

Con base en estos resultados, se seleccionaron tres concentraciones para la Fase II: 50 mg L^{-1} (por su claro efecto promotor), 125 mg L^{-1} (por representar un efecto intermedio consistente) y 150 mg L^{-1} (por su efecto contrastante, especialmente a 48 h). El tiempo de imbibición seleccionado fue de 24 h, por mostrar los efectos más pronunciados en las variables de crecimiento.

Fase II. Efecto del tiempo de almacenamiento y los MWCNT

Una vez seleccionadas las concentraciones representativas en el lote más reciente, se procedió a evaluar su efecto en lotes con diferentes tiempos de almacenamiento (2015, 2016, 2022 y 2024), con el fin de determinar si la respuesta a los MWCNT está modulada por el deterioro asociado al almacenamiento prolongado.

Caracterización inicial de los lotes de semillas

Antes de aplicar los tratamientos, se caracterizó el estado basal de cada lote mediante análisis morfométricos y pruebas de viabilidad. La Tabla 2 presenta esta caracterización inicial, que permite interpretar las respuestas posteriores a los MWCNT.

Tabla 2. Caracterización morfométrica y viabilidad inicial de cuatro lotes de semillas de *Agave salmiana* con diferente tiempo de almacenamiento.
Table 2. Morphometric characterization and initial viability of four seed lots of *Agave salmiana* with different storage times.

Lote	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Grosor (mm)	Peso (mg)	Viabilidad TTC (%)	Semillas sin embrión (%)
2015	6.8 ± 0.1 c	4.8 ± 0.1 b	0.5 ± 0.02 b	7.8 ± 0.2 c	18.5 ± 2.1 c	8.0 ± 1.6 b
2016	8.3 ± 0.1 a	5.2 ± 0.1 ab	0.4 ± 0.02 b	8.6 ± 0.2 bc	64.9 ± 3.5 b	28.0 ± 2.9 a
2022	7.1 ± 0.1 b	5.1 ± 0.1 ab	0.5 ± 0.02 b	9.1 ± 0.2 b	78.0 ± 2.9 a	6.0 ± 1.6 b
2024	8.2 ± 0.1 a	5.9 ± 0.2 a	0.6 ± 0.03 a	11.0 ± 0.3 a	14.7 ± 2.4 c	6.8 ± 1.8 b

Los valores representan la media ± error estándar (n=4 repeticiones de 25 semillas). Medias con la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$).

El análisis morfométrico reveló diferencias significativas entre lotes. El lote 2024 presentó las semillas con mayor grosor y peso ($p < 0.05$), indicando un mejor estado de llenado y mayor reserva de nutrientes. En contraste, el lote más antiguo (2015) mostró las semillas con menor longitud y peso, lo que sugiere un posible deterioro o menor calidad inicial.

Sin embargo, la prueba de viabilidad con tetrazolio (Figura 1) mostró un patrón inesperado y relevante. Los lotes 2022 y 2016 presentaron la viabilidad más alta (78% y 64.9%, respectivamente), con diferencias significativas entre ellos y respecto a los demás. Sorprendentemente, el lote 2024, a pesar de su mayor tamaño y peso, mostró una viabilidad significativamente baja (14.7%), comparable con el lote más antiguo de 2015 (18.5%). Este resultado sugiere que, en *A. salmiana*, el tamaño de la semilla no es un predictor directo de su viabilidad fisiológica.

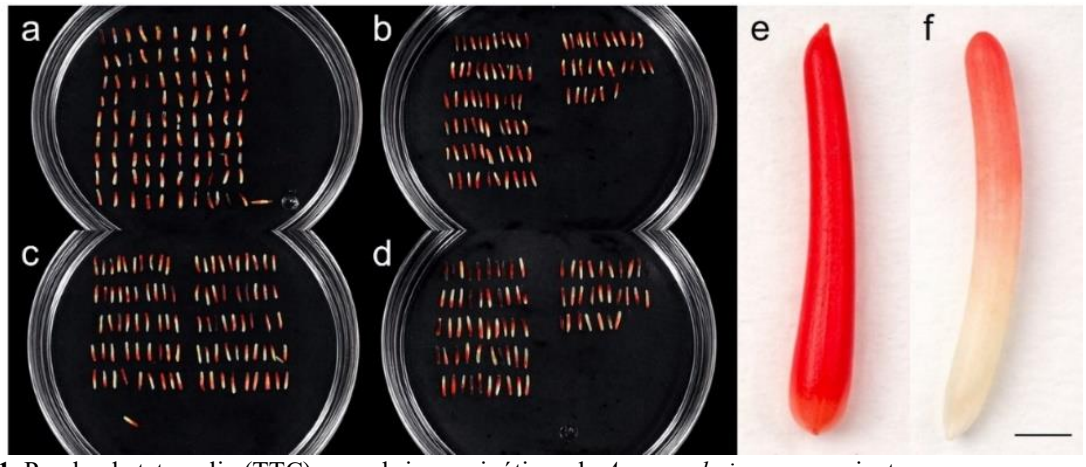


Figura 1. Prueba de tetrazolio (TTC) en embriones cigóticos de *Agave salmiana* provenientes de cuatro lotes de almacenamiento. a) Lote 2015, b) Lote 2016, c) Lote 2022, d) Lote 2024, e) embrión viable y f) embrión no viable. Barra = 1 mm.
Figure 1. Tetrazolium test (TTC) in *Agave salmiana* embryos from four storage lots. a) 2015 lot, b) 2016 lot, c) 2022 lot, d) 2024 lot, e) viable embryo, f) non-viable embryo.

Los embriones viables presentaron coloración roja intensa y homogénea, indicando actividad deshidrogenasa mitocondrial; mientras que los embriones no viables se caracterizan por coloración parcial o ausencia de tinción (incoloros) (ISTA, 2023). Barra = 1 mm
Adicionalmente, el lote 2016 destacó por presentar un alto porcentaje de semillas sin embrión (28%), significativamente superior al de los otros lotes (6-8%). Esta característica morfoanatómica constituye un factor limitante determinante en su potencial germinativo, independientemente de los tratamientos aplicados.

Germinación y desarrollo inicial (28 días)
La Figura 2 muestra el porcentaje de germinación acumulada a los 28 días para los cuatro lotes de semillas, tratados con las concentraciones seleccionadas de MWCNT (0, 50, 125 y 150 mg L^{-1}) durante 24 h de imbibición.

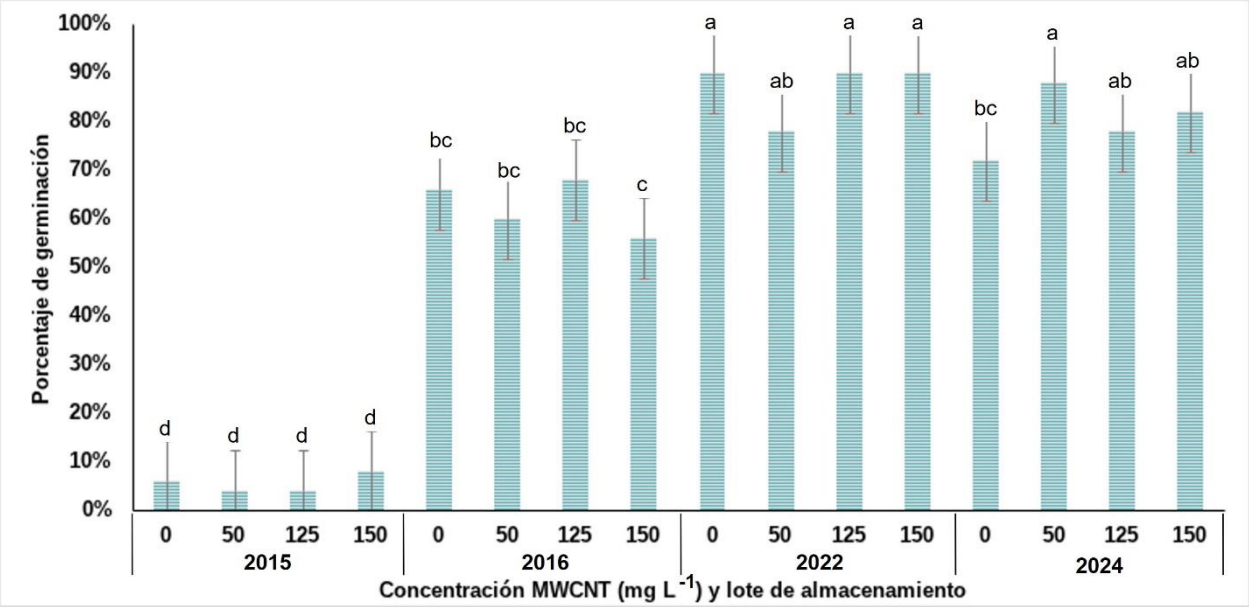


Figura 2. Porcentaje de germinación acumulada a 28 días de semillas de *Agave salmiana* de cuatro lotes de almacenamiento (2015, 2016, 2022, 2024), tratadas con cuatro concentraciones de MWCNT (0, 50, 125, 150 mg L^{-1}) durante 24 h de imbibición.
Figure 2. Cumulative germination percentage at 28 days of *Agave salmiana* seeds from four storage lots (2015, 2016, 2022, 2024), treated with four MWCNT concentrations (0, 50, 125, 150 mg L^{-1}) for 24 h.

Los valores son la media ± error estándar (n=5). Barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$). La comparación es válida entre todos los tratamientos y lotes.
El análisis de varianza reveló un efecto significativo ($p < 0.05$) tanto del lote (tiempo de almacenamiento) como de la concentración de MWCNT, así como de su interacción. Esto indica que la respuesta a los nanotubos depende del estado fisiológico basal de las semillas.
Los lotes más recientes (2022 y 2024) presentaron los porcentajes de germinación más altos, aunque con patrones de respuesta distintos. El lote 2022 alcanzó su máxima germinación (90%) con el tratamiento testigo (0 mg L^{-1}), y los tratamientos con MWCNT no lograron superar este valor, manteniéndose en un rango de 82-86%. En contraste, el lote 2024 respondió positivamente a los MWCNT, incrementando significativamente su germinación del 72% (testigo) al 88% con 50 mg L^{-1}. Las concentraciones de 125 y 150 mg L^{-1} también mejoraron la germinación (78% y 82%, respectivamente), aunque sin alcanzar la significancia estadística respecto al testigo.
El lote 2016 mostró una germinación moderada, con valores entre 58% y 68%. El tratamiento con 125 mg L^{-1} (68%) superó ligeramente al testigo (66%), aunque las diferencias no fueron

estadísticamente significativas. Finalmente, el lote 2015 presentó una germinación prácticamente nula (≤2%) en todos los tratamientos, evidenciando una pérdida irreversible de viabilidad asociada al almacenamiento prolongado.

La Figura 3 complementa estos resultados mostrando el desarrollo de las plántulas a los 28 días, evaluado mediante la longitud de hoja y raíz.

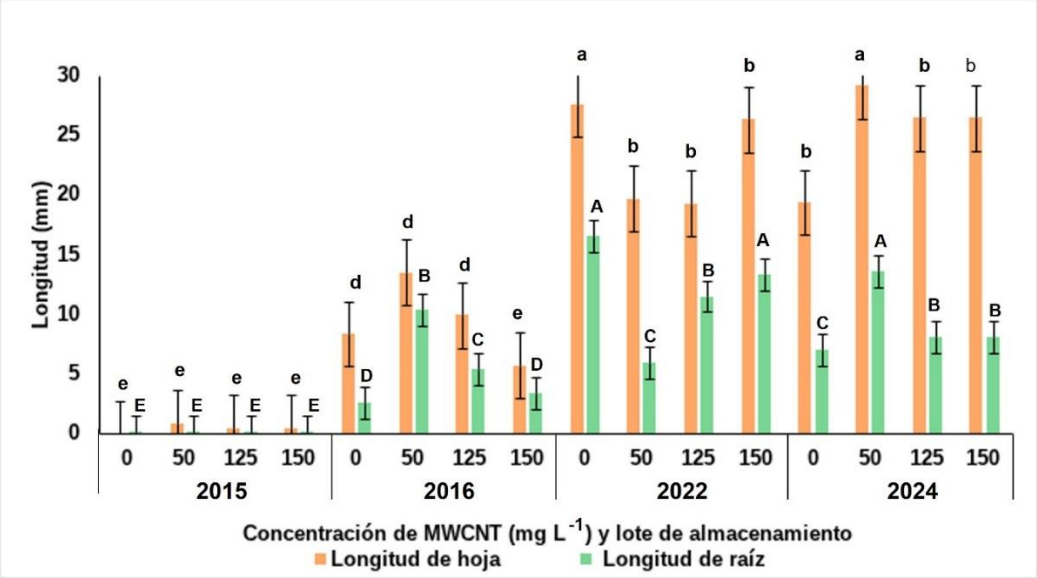


Figura 3. Longitud de hoja y raíz (mm) a los 28 días después de *Agave salmiana* provenientes de cuatro lotes de almacenamiento (2015, 2016, 2022, 2024), tratadas con cuatro concentraciones de MWCNT (0, 50, 125, 150 mg L^{-1}) durante 24 h de imbibición.

Figure 3. Leaf and root length (mm) at 28 days after sowing in *Agave salmiana* seedlings from four storage lots (2015, 2016, 2022, 2024), treated with four MWCNT concentrations (0, 50, 125, 150 mg L^{-1}) for 24 h.

Los valores son la media ± error estándar. Barras con la misma letra (minúsculas para hoja, mayúsculas para raíz) no son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$). La comparación es válida entre todos los tratamientos y lotes para cada variable.

El desarrollo de las plántulas reflejó el mismo patrón observado en germinación, pero con matices importantes. El lote 2022 produjo las plántulas con mayor longitud de hoja y raíz, destacando el tratamiento testigo (27.6 mm y 16.6 mm, respectivamente) y el de 150 mg L^{-1} (26.3 mm y 13.4 mm), sin diferencias significativas entre ellos.

En el lote 2024, el tratamiento con 50 mg L^{-1} estimuló significativamente el crecimiento, alcanzando 19.7 mm de longitud de hoja y 15.9 mm de raíz, valores que superaron ampliamente al testigo (8.4 mm y 2.7 mm, respectivamente). Este resultado es particularmente relevante, ya que las plántulas del testigo mostraron un desarrollo muy limitado, mientras que las tratadas con 50 mg L^{-1} alcanzaron un vigor comparable al de los mejores tratamientos del lote 2022.

El lote 2016 mostró una respuesta positiva a la concentración de 50 mg L^{-1}, alcanzando los mayores valores de su lote (13.6 mm de hoja y 10.4 mm de raíz), con diferencias significativas respecto al testigo (8.4 mm y 2.7 mm). Las concentraciones más altas (125 y 150 mg L^{-1}) produjeron un crecimiento intermedio. El lote 2015, coherente con su nula germinación, presentó un crecimiento prácticamente nulo en las escasas plántulas obtenidas.

Adaptación y crecimiento en invernadero

La Tabla 3 muestra la capacidad de adaptación y el crecimiento de las plántulas tras 2 meses de aclimatación en condiciones de invernadero. El lote 2015 no presentó supervivencia en ninguna condición, por lo que fue excluido del análisis.

Tabla 3. Supervivencia (%) y morfometría de plántulas de *Agave salmiana* provenientes de tres lotes de almacenamiento (2016, 2022, 2024) después de 2 meses de adaptación en invernadero.
Table 3. Survival (%) and morphometry of *Agave salmiana* seedlings from three storage lots (2016, 2022, 2024) after two months of greenhouse acclimatization.

Lote	Concentración (mg L^{-1})	Supervivencia (%)	Longitud hoja (mm)	Longitud raíz (mm)
2016	0	0.0 ± 0.0 e	-	-
	50	72.0 ± 4.9 bc	21.3 ± 0.9 bc	15.9 ± 1.0 a
	125	42.0 ± 4.9 d	19.9 ± 0.8 c	9.4 ± 0.7 b
	150	64.0 ± 5.1 c	21.9 ± 0.9 b	13.0 ± 0.9 a
2022	0	97.0 ± 2.0 a	36.9 ± 1.5 a	17.9 ± 1.1 a
	50	91.0 ± 2.4 a	34.3 ± 1.3 a	17.3 ± 1.0 a
	125	90.0 ± 2.4 a	33.7 ± 1.3 a	16.1 ± 1.0 a
	150	97.0 ± 2.0 a	22.0 ± 1.0 bc	21.0 ± 1.2 a
2024	0	95.0 ± 2.9 a	42.4 ± 1.8 a	29.5 ± 1.5 a
	50	94.0 ± 2.4 a	39.8 ± 1.6 a	41.9 ± 2.1 b
	125	85.0 ± 2.9 ab	33.5 ± 1.4 a	30.1 ± 1.6 a
	150	91.0 ± 2.4 a	43.1 ± 1.8 a	37.3 ± 1.9 b

Los valores representan la media ± error estándar. Medias con la misma letra dentro de cada columna (y por lote, para supervivencia) no son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$). El lote 2015 no se incluye por nula supervivencia.

La fase de adaptación en invernadero evidenció contrastes notables entre lotes, tanto en supervivencia como en crecimiento.

En este sentido, los lotes 2022 y 2024 mantuvieron una supervivencia excepcionalmente alta (>85%) en todos los tratamientos, sin diferencias significativas entre concentraciones. Este resultado indica que, una vez superada la fase de germinación, las plántulas de estos lotes poseen una notable capacidad de aclimatación, independientemente del tratamiento previo con MWCNT.

En contraste, el lote 2016 mostró una supervivencia moderada y dependiente del tratamiento. El valor más alto (72%) se registró con 50 mg L^{-1}, seguido de 150 mg L^{-1} (64%) y 125 mg L^{-1} (42%). El tratamiento testigo presentó supervivencia nula, lo que sugiere que, en este lote con deterioro intermedio, los MWCNT no solo promovieron la germinación, sino que fueron determinantes para la supervivencia posterior.

Respecto al crecimiento en invernadero, el análisis reveló efectos diferenciales según el lote y la concentración. En el lote 2024, se observó un efecto promotor específico de los MWCNT sobre el sistema radicular. Los tratamientos con 50 y 150 mg L^{-1} incrementaron significativamente la longitud de la raíz (41.9 mm y 37.3 mm, respectivamente) en comparación con el testigo (29.5 mm), representando aumentos del 42% y 26%. La longitud de hoja, sin embargo, no mostró diferencias significativas entre tratamientos, oscilando entre 33.5 y 43.1 mm.

En el lote 2016, los tratamientos con 50 y 150 mg L^{-1} también favorecieron un mayor desarrollo radicular (15.9 mm y 13.0 mm, respectivamente), aunque con valores absolutos inferiores a los del lote 2024. La longitud de hoja mostró un patrón similar, con los valores más altos en estos mismos tratamientos.

El lote 2022 presentó un comportamiento distinto: no se observaron diferencias significativas entre tratamientos para ninguna variable de crecimiento, con la excepción de una menor longitud de hoja en el tratamiento de 150 mg L^{-1} (22.0 mm) respecto al testigo (36.9 mm). Este resultado sugiere que las semillas de este lote, con alta viabilidad inicial y excelente germinación, fueron menos sensibles al estímulo de los nanotubos en esta fase, posiblemente porque ya expresaban su máximo potencial fisiológico.

En conjunto, estos resultados indican que el efecto de los MWCNT sobre el crecimiento en invernadero es más pronunciado en lotes con cierto grado de deterioro (2016) o con viabilidad

inicial baja pero buen potencial de respuesta (2024), mientras que en lotes con alta calidad fisiológica basal (2022) el efecto es neutro o incluso ligeramente negativo a altas concentraciones.

DISCUSIÓN

Efecto dosis-dependiente de los MWCNT

Los resultados de la Fase I demostraron que los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) modulan la germinación y el desarrollo inicial de *A. salmiana* de manera dosis-dependiente, con un efecto promotor óptimo a 50 mg L^{-1} y una transición hacia respuestas inhibitorias en concentraciones superiores a 100 mg L^{-1}. Este comportamiento bifásico, característico de una respuesta hormética, ha sido documentado en diversas especies vegetales expuestas a nanomateriales de carbono (Khodakovskaya *et al.*, 2012; Lahiani *et al.*, 2017; Mukherjee *et al.*, 2016).

El incremento significativo en germinación (88%), longitud de hoja (29.2 mm) y longitud de raíz (13.6 mm) observado con 50 mg L^{-1} sugiere que los MWCNT, a dosis moderadas, actúan como nanoestimulantes capaces de penetrar la testa seminal y modificar positivamente los microambientes celulares. Mecanismos propuestos incluyen: (i) la creación de poros o canales que facilitan la imbibición y el intercambio gaseoso (Khodakovskaya *et al.*, 2009); (ii) la activación de acuaporinas y genes relacionados con la división celular (Khodakovskaya *et al.*, 2012); y (iii) la modulación del balance hormonal, particularmente de auxinas y citoquininas, que regulan la elongación radicular y foliar (Lahiani *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2025).

En contraste, las concentraciones de 125 y 150 mg L^{-1} produjeron respuestas erráticas y, en algunos casos, inhibitorias. A 48 h de exposición, la germinación con 150 mg L^{-1} descendió a 76% y la supervivencia en invernadero se redujo drásticamente a 68%, el valor más bajo registrado. Este patrón es consistente con estudios que reportan fitotoxicidad por MWCNT a dosis elevadas, atribuida a estrés oxidativo generado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), peroxidación lipídica y daño a membranas celulares (Begum & Fugetsu, 2012; Ghodake *et al.*, 2010; R. Wang *et al.*, 2017). La transición entre estimulación y toxicidad observada en nuestro estudio refuerza la noción de que los MWCNT poseen una ventana óptima de concentración, más allá de la cual los efectos negativos predominan (Villagarcia *et al.*, 2012).

El tiempo de almacenamiento como modulador de la respuesta a MWCNT

Un hallazgo central de este trabajo es que el efecto de los MWCNT está fuertemente modulado por el estado fisiológico basal de las semillas, determinado por su tiempo de almacenamiento. La caracterización inicial de los lotes (Tabla 2) reveló diferencias profundas en viabilidad y calidad: mientras los lotes 2022 y 2016 presentaron alta viabilidad (78% y 64.9%, respectivamente), el lote 2024, a pesar de su mayor tamaño y peso, mostró una viabilidad sorprendentemente baja (14.7%), comparable con el lote más antiguo de 2015 (18.5%). Este resultado contradice la expectativa intuitiva de que semillas más recientes y de mayor tamaño poseen necesariamente mayor viabilidad, y subraya la importancia de evaluar directamente la calidad fisiológica más allá de caracteres morfométricos (Hampton, 2002; ISTA, 2023).

La respuesta a los MWCNT reflejó estas diferencias basales. El lote 2022, con alta viabilidad, mostró una germinación excelente incluso en el testigo (90%), y los MWCNT no lograron superar este valor, sugiriendo que semillas con calidad fisiológica óptima pueden haber alcanzado ya su máximo potencial germinativo, siendo menos sensibles a estímulos externos (Bewley *et al.*, 2013). En contraste, el lote 2024, con baja viabilidad, pero buen potencial de respuesta experimentó el beneficio más pronunciado: la germinación aumentó del 72% (testigo) al 88% con 50 mg L^{-1}, y el crecimiento de plántulas se multiplicó varias veces (de 8.4 a 19.7 mm en hoja; de 2.7 a 15.9 mm en raíz). Este patrón sugiere que los MWCNT pueden rescatar parcialmente el potencial fisiológico de semillas con cierto grado de deterioro, posiblemente activando vías metabólicas latentes o compensando deficiencias en la imbibición (Khodakovskaya *et al.*, 2011; Martínez-Ballesta *et al.*, 2016). El lote 2016, con viabilidad intermedia (64.9%) pero un alto porcentaje de semillas sin embrión (28%), mostró una respuesta moderada a los MWCNT. La

concentración de 50 mg L^{-1} mejoró significativamente el crecimiento de plántulas, aunque la supervivencia en invernadero fue limitada (máximo 72%). Este resultado indica que, en lotes con problemas estructurales (ausencia de embrión), los beneficios de los MWCNT pueden verse restringidos por factores intrínsecos no modificables (Jimenez-Torres *et al.*, 2022). Finalmente, el lote 2015, con deterioro avanzado y viabilidad casi nula, no respondió a ningún tratamiento, confirmando que existe un umbral de deterioro más allá del cual ningún estímulo externo puede restaurar la capacidad germinativa (Ellis & Roberts, 1980; Walters *et al.*, 2005).

Efectos diferenciales sobre órganos y persistencia en invernadero

Un aspecto novedoso de este estudio es el seguimiento del efecto de los MWCNT hasta la fase de adaptación en invernadero (2 meses después de la germinación). En el lote 2024, los tratamientos con 50 y 150 mg L^{-1} incrementaron significativamente la longitud radicular (41.9 mm y 37.3 mm, respectivamente) respecto al testigo (29.5 mm), representando aumentos del 42% y 26%. Este efecto persistente sugiere que los MWCNT no solo actúan durante la imbibición y germinación, sino que pueden inducir cambios duraderos en la arquitectura radicular, posiblemente a través de la modulación de genes involucrados en el desarrollo de raíces laterales y pelos absorbentes (F.-X. Wang *et al.*, 2022; Zuverza-Mena *et al.*, 2017).

La longitud de hoja, en cambio, no mostró diferencias significativas en este lote, indicando un efecto órgano-específico. Este patrón ha sido reportado previamente: los MWCNT tienden a favorecer el desarrollo radicular sobre el aéreo en dosis moderadas, posiblemente porque las raíces están en contacto directo con el nanomaterial durante más tiempo y porque las vías de señalización de auxinas, que regulan la elongación radicular, son particularmente sensibles a nanoestimulantes (Lahiani *et al.*, 2017; Syu *et al.*, 2014) .

En contraste, el lote 2022 no mostró diferencias significativas entre tratamientos en invernadero, con la excepción de una menor longitud de hoja a 150 mg L^{-1}. Este resultado refuerza la idea de que lotes con alta calidad fisiológica basal pueden ser menos responsivos a estímulos externos, o incluso experimentar efectos negativos a dosis elevadas debido a un desbalance en la asignación de recursos (Hatami *et al.*, 2016). La supervivencia excepcionalmente alta (>90%) de este lote en todas las condiciones indica que, una vez superada la germinación, las plántulas de *A. salmiana* poseen una notable plasticidad y tolerancia fisiológica, como ha sido documentado en otras especies de agave (Alvarado Cepeda *et al.*, 2024; Álvarez-Duarte *et al.*, 2018).

Implicaciones para la nanotecnología agrícola y la conservación de germoplasma

Los resultados de este trabajo tienen implicaciones prácticas significativas. En primer lugar, demuestran que los MWCNT pueden ser herramientas valiosas para mejorar la germinación y el establecimiento temprano de *A. salmiana*, una especie de importancia ecológica, cultural y económica en México (Álvarez-Duarte *et al.*, 2018; Torres-García *et al.*, 2019). La concentración de 50 mg L^{-1} emerge como una dosis de referencia para futuros estudios y aplicaciones, aunque se requiere validación en condiciones de campo y con un espectro más amplio de genotipos.

En segundo lugar, los hallazgos subrayan la necesidad de considerar la calidad fisiológica de las semillas como variable crítica en estudios de nanoestimulación. Investigaciones previas han reportado efectos positivos de MWCNT en especies como tomate, tabaco, trigo y maíz (Khodakovskaya *et al.*, 2009; Lahiani *et al.*, 2017; Mukherjee *et al.*, 2016), pero rara vez han considerado explícitamente la edad o el estado de deterioro del material seminal. Nuestros resultados indican que ignorar esta variable puede llevar a conclusiones sesgadas o inconsistentes.

En tercer lugar, la persistencia del efecto radicular hasta 2 meses después del tratamiento abre preguntas sobre los mecanismos subyacentes y la posible transferencia de MWCNT a tejidos vegetales superiores. Estudios de trazado con isotopos o microscopía electrónica serían necesarios para determinar si los nanotubos son internalizados y translocados, o si sus efectos son puramente epigenéticos o mediados por señales hormonales (Lin *et al.*, 2009; Serag *et al.*, 2013).

Finalmente, es importante señalar que, si bien los MWCNT mostraron efectos beneficiosos en dosis moderadas, también evidenciaron potencial fitotóxico a concentraciones elevadas. Esto subraya la importancia de desarrollar protocolos de aplicación seguros y de realizar evaluaciones de bioseguridad a mediano y largo plazo, particularmente si se contempla su uso en sistemas

agrícolas abiertos donde podrían acumularse en suelos o aguas (Gardea-Torresdey *et al.*, 2014; Rico *et al.*, 2011).

Limitaciones del estudio y perspectivas futuras

Este estudio presenta limitaciones que deben reconocerse. La primera es que no se realizaron análisis bioquímicos o moleculares (e.g., actividad antioxidante, expresión génica, cuantificación de ROS) que permitieran corroborar directamente los mecanismos propuestos. Futuros trabajos deberían incorporar estas aproximaciones para validar las hipótesis sobre estrés oxidativo y activación génica.

La segunda limitación es que los experimentos se realizaron en condiciones controladas de laboratorio e invernadero. La traducción de estos resultados a condiciones de campo, donde las variables ambientales fluctúan y existen interacciones bióticas, requerirá estudios adicionales.

La tercera es que no se evaluó el posible efecto de los MWCNT sobre la microbiota del sustrato o sobre la salud del suelo, aspectos cruciales para una evaluación integral de su impacto ambiental.

A pesar de estas limitaciones, el trabajo aporta evidencia robusta sobre el potencial de los MWCNT como nanoestimulantes en *A. salmiana*, y establece una base metodológica para futuras investigaciones en la interfaz entre nanotecnología, fisiología de semillas y conservación de recursos fitogenéticos.

CONCLUSIONES

Este estudio demuestra, por primera vez en *A. salmiana*, que los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) actúan como nanoestimulantes dosis-dependientes, capaces de mejorar significativamente la germinación y el desarrollo temprano de plántulas cuando se aplican en concentraciones moderadas (25–50 mg L^{-1}). La concentración de 50 mg L^{-1} emergió como la más efectiva, incrementando la germinación hasta en un 22% respecto al testigo y potenciando el crecimiento radicular y foliar en más de un 100% en lotes con calidad fisiológica adecuada. Este efecto promotor se atribuye a la capacidad de los MWCNT para facilitar la imbibición y activar rutas metabólicas clave durante las fases iniciales del desarrollo, aunque los mecanismos moleculares precisos requieren confirmación en estudios futuros.

Un hallazgo central y novedoso es que la respuesta a los MWCNT está fuertemente modulada por el estado fisiológico basal de las semillas, determinado por su tiempo de almacenamiento. Las semillas con menos de tres años de almacenamiento (lotes 2022–2024) mostraron la mayor capacidad de respuesta, mientras que lotes con deterioro avanzado (lote 2015) resultaron irresponsivos a cualquier concentración. Este patrón revela que la efectividad de la nanoestimulación no depende exclusivamente de la dosis, sino de una interacción compleja entre el nanomaterial y la integridad estructural y metabólica del embrión. Sorprendentemente, el tamaño de la semilla no resultó un predictor fiable de la viabilidad, como evidenció el lote 2024, que, a pesar de presentar las semillas de mayor peso y grosor, mostró una viabilidad excepcionalmente baja (14.7%), comparable al lote más antiguo.

Los resultados también confirman que los MWCNT presentan un comportamiento hormético: mientras que dosis moderadas (≤50 mg L^{-1}) produjeron efectos bioestimulantes consistentes, concentraciones elevadas (≥125 mg L^{-1}) indujeron respuestas erráticas o inhibitorias, particularmente en variables como supervivencia en invernadero y elongación radicular. Esta transición entre estimulación y toxicidad subraya la necesidad de establecer ventanas óptimas de aplicación y de evitar generalizaciones sobre la seguridad de los nanomateriales basadas únicamente en ensayos a corto plazo.

Desde una perspectiva aplicada, este trabajo proporciona bases metodológicas sólidas para incorporar nanotecnología en programas de propagación y conservación de germoplasma de agaves, un género de enorme relevancia ecológica, cultural y económica en México. La

concentración de 50 mg L^{-1} con 24 h de imbibición emerge como un protocolo de referencia para futuras validaciones en condiciones de campo y para su posible escalamiento a otros sistemas de interés agronómico.

En síntesis, este trabajo establece que los MWCNT, utilizados en dosis adecuadas y sobre material seminal de calidad, constituyen una herramienta prometedora para mejorar la germinación y el establecimiento temprano de *A. salmiana*, pero enfatiza que su efectividad está indisolublemente ligada al estado fisiológico de las semillas y a un riguroso control de las condiciones de aplicación. Estos hallazgos contribuyen al creciente cuerpo de conocimiento sobre nano-bio-interacciones en plantas y abren nuevas perspectivas para la biotecnología de recursos fitogenéticos.

Fuentes de financiamiento

Esta investigación fue financiada por la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación del Gobierno de México, a través del proyecto CBF-2025-I-463.

LITERATURA CITADA

Aguirre-Dugua, X., & Eguiarte, L. E. (2013). Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments*, *90*, 36–44. https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.10.018

Alvarado Cepeda, Y. A., Vega Chávez, J. L., Felipe Victoriano, M., & Reyes Arreozola, M. I. (2024). Evaluación de residuos agrícolas como sustratos en la emergencia y desarrollo de plántulas de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck. *Acta Universitaria*, *34*, 1–8. https://doi.org/10.15174/au.2024.4041

Alvarez-Aragón, C., Arzate-Fernandez, A.-M., Martínez-Martínez, S.-Y., & Martínez-Velasco, I. (2020). Regeneración de plantas de *Agave marmorata* Roezl, vía embriogénesis somática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, *23*(2). https://doi.org/10.56369/tsaes.3117

Álvarez-Duarte, M. del C., Garcia-Moya, E., Suarez-Espinosa, J., Luna-Cavazos, M., & Rodriguez-Acosta, M. (2018). Conocimiento tradicional, cultivo y aprovechamiento del maguey pulquero en los municipios de Puebla y Tlaxcala. *Polibotánica*, (45), 205–222.

Begum, P., & Fugetsu, B. (2012). Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes on red spinach (*Amaranthus tricolor* L) and the role of ascorbic acid as an antioxidant. *Journal of Hazardous Materials*, *243*, 212–222.

Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., & Nonogaki, H. (2013). Seeds: Physiology of development, germination and dormancy, 3rd edition. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd Edition*, *9781461446934*, 1–392. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4

Cañas, J. E., Long, M., Nations, S., Vadan, R., Dai, L., Luo, M., Ambikapathi, R., Lee, E. H., & Olszyk, D. (2008). Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environmental toxicology and chemistry*, *27*(9), 1922–1931.

Ellis, R. H., & Roberts, E. H. (1980). Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*, *45*(1), 13–30.

García-Mendoza, A. (2002). *Distribution of agave (Agavaceae) in México.*

Gardea-Torresdey, J. L., Rico, C. M., & White, J. C. (2014). Trophic transfer, transformation, and impact of engineered nanomaterials in terrestrial environments. *Environmental Science & Technology*, 48(5), 2526–2540.

Gentry, H. S. (2004). Agaves of continental north America. University of Arizona Press.

Ghodake, G., Seo, Y. D., Park, D., & Lee, D. S. (2010). Phytotoxicity of carbon nanotubes assessed by *Brassica juncea* and *Phaseolus mungo. Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics*, 5(2), 157–160.

Hampton, J. G. (2002). Producing quality seed: the problem of seed vigour. Special publication-agronomy society of new zealand, 53–62.

Hatami, M., Kariman, K., & Ghorbanpour, M. (2016). Engineered nanomaterial-mediated changes in the metabolism of terrestrial plants. Science of the total environment, 571, 275–291.

ISTA. (2023). Guidelines for the establishment and management of seed testing laboratories. En Guidelines for the establishment and management of seed testing laboratories. FAO; International Seed Testing Association (ISTA); https://doi.org/10.4060/cc6103en

Jimenez-Torres, J. A., Monroy-Gonzalez, Z., Juarez-Muñoz, J., & Jørgensen, B. (2022). Evaluation of seed morphology, seedling genetic variation, and components for seed storage of *Agave* landraces of commercial interest. Experimental Results, 3, e25.

Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F., & Biris, A. S. (2009). Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. ACS nano, 3(10), 3221–3227.

Khodakovskaya, M. V, De Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E., & Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. ACS nano, 6(3), 2128–2135.

Khodakovskaya, M. V, de Silva, K., Nedosekin, D. A., Dervishi, E., Biris, A. S., Shashkov, E. V, Galanzha, E. I., & Zharov, V. P. (2011). Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(3), 1028–1033.

Khodakovskaya, M. V, Kim, B., 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.

Lahiani, M. H., Nima, Z. A., Villagarcia, H., Biris, A. S., & Khodakovskaya, M. V. (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.

Lin, S., Reppert, J., Hu, Q., Hudson, J. S., Reid, M. L., Ratnikova, T. A., Rao, A. M., Luo, H., & Ke, P. C. (2009). Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants. Small, 5(10), 1128–1132.

Martínez-Ballesta, M. C., Zapata, L., Chalbi, N., & Carvajal, M. (2016). Multiwalled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. Journal of nanobiotechnology, 14(1), 42.

Mukherjee, A., Majumdar, S., Servin, A. D., Pagano, L., Dhankher, O. P., & White, J. C. (2016). Carbon nanomaterials in agriculture: a critical review. Frontiers in plant science, 7, 172.

Ramírez-Tobías, H. M., & Peña-Valdivia, C. B. (s/f). JR Aguirre R, JA Reyes-Agüero, AB Sánchez-Urdaneta, S Valle-Guadarrama (2011) Seed germination temperatures of eight Mexican Agave species with an extensive history of human use. Plant Species Biol. (in press). Doi, 10.

Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2011). Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(8), 3485–3498.

Serag, M. F., Kaji, N., Habuchi, S., Bianco, A., & Baba, Y. (2013). Nanobiotechnology meets plant cell biology: carbon nanotubes as organelle targeting nanocarriers. RSC advances, 3(15), 4856–4862.

Servin, A., Elmer, W., Mukherjee, A., De la Torre-Roche, R., Hamdi, H., White, J. C., Bindraban, P., & Dimkpa, C. (2015). A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(2), 92.

Syu, Y., Hung, J.-H., Chen, J.-C., & Chuang, H. (2014). Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression. *Plant physiology and biochemistry*, 83, 57–64.

Torres-García, I., Rendón-Sandoval, F. J., Blancas, J., & Moreno-Calles, A. I. (2019). The genus *Agave* in agroforestry systems of Mexico. Botanical Sciences, 97(3), 263–290.

Velázquez Reyes, H. H., & Ruíz Torres, N. A. (2014). Estudio fisiológico en familias prolíficas de un lote de producción de semilla de la variedad de maíz jaguan.

Recibido / Received:
10/diciembre/2025

Recepción de versión corregida / Revised version received:
26/marzo/2026

Aceptado / Accepted:
2/junio/2026

Villagarcia, H., Dervishi, E., de Silva, K., Biris, A. S., & Khodakovskaya, M. V. (2012). Surface chemistry of carbon nanotubes impacts the growth and expression of water channel protein in tomato plants. Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany), 8(15), 2328–2334.

Walters, C., Wheeler, L. M., & Grotenhuis, J. M. (2005). Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research*, 15(1), 1–20.

Wang, F.-X., Shang, G.-D., & Wang, J.-W. (2022). Towards a hierarchical gene regulatory network underlying somatic embryogenesis. *Trends in Plant Science*, 27(12), 1209–1217. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.06.002

Wang, R., Xue, Q., Wang, J., Tan, L., Zhang, Q., Zhao, Y., & Anderson, D. M. (2017). Effects of an allelochemical in *Phaeodactylum tricornutum* filtrate on *Heterosigma akashiwo*: morphological, physiological and growth effects. *Chemosphere*, 186, 527–534.

Zhang, W., Zhang, L., Jiang, W., Yang, H., Yang, T., Zhao, Y., Zhang, Z., & Ma, Y. (2025). DNA methylation regulates somatic stress memory and mediates plasticity during acclimation to repeated sulfide stress in *Urechis unicinctus*. *Journal of Hazardous Materials*, 487, 137264. https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2025.137264

Zizumbo-Villarreal, D., González-Zozaya, F., Olay-Barrientos, A., Platas-Ruíz, R., Cuevas-Sagardí, M., Almendros-López, L., & Colunga-GarcíaMarín, P. (2009). Archaeological evidence of the cultural importance of *Agave* spp. in Pre-Hispanic Colima, Mexico. *Economic Botany*, 63(3), 288–302. https://doi.org/10.1007/s12231-009-9092-5

Zuverza-Mena, N., Martínez-Fernández, D., Du, W., Hernandez-Viezcas, J. A., Bonilla-Bird, N., López-Moreno, M. L., Komárek, M., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2017). Exposure of engineered nanomaterials to plants: Insights into the physiological and biochemical responses-A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 236–264.