

## Seed Treatment with Carbon Nanomaterials Impacts Growth and Nutrient Absorption in Tomato Under Saline Stress

### El Tratamiento de Semillas con Nanomateriales de Carbono Impacta en el Crecimiento y Absorción de Nutrientes en Tomate Bajo Estrés Salino

López-Vargas, E. R.<sup>1</sup>, Pérez-Álvarez, M.<sup>2</sup>, Cadenas-Pliego, G.<sup>3</sup>, Hernández-Fuentes, A. D.<sup>4</sup>, Juárez-Maldonado, A.<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Doctorado en Agricultura Protegida, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. <sup>2</sup>Instituto Mexicano del Petróleo, Ciudad de México, México. <sup>3</sup>Centro de Investigación en Química Aplicada, Saltillo, Coahuila, México. <sup>4</sup>Instituto de Ciencias Agropecuarias, Tulancingo, Hidalgo, México. <sup>5</sup>Departamento de Botánica, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** López-Vargas, E. R., Pérez-Álvarez, M., Cadenas-Pliego, G., Hernández-Fuentes, A. D., Juárez-Maldonado, A. (2021). Seed Treatment with Carbon Nanomaterials Impacts Growth and Nutrient Absorption in Tomato Under Saline Stress. *Revista Bio Ciencias* 8, e1090. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.08.e1090>



#### ABSTRACT

In the present study, the effects of the treatment of tomato seeds with carbon nanotubes (CNT) and graphene (GP), at concentrations of 50, 250 and 500 mg L<sup>-1</sup> and two controls (without sonication and sonicated) in growth, development and mineral absorption in tomato plants were evaluated. Two conditions of saline stress were considered: without saline stress (No NaCl) and with saline stress (50 mM NaCl). The application of GP and CNT in plants without saline stress did not affect most of the morphological parameters, such as average fruit weight and yield. The fresh and dry biomasses, both root and aerial, were modified by carbon nanomaterials (CNMs). On the other hand, the height of the plants under salinity increased significantly with the treatment of GP and CNT at the lowest dose (50

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: October 28<sup>th</sup> 2020.

Accepted/Aceptado: July 03<sup>th</sup> 2021.

Available on line/Publicado: July 28<sup>th</sup> 2021.

#### RESUMEN

En el presente estudio, se evaluaron los efectos del tratamiento de semillas de tomate con nanotubos de carbono (CNT) y grafeno (GP), a concentraciones de 50, 250 y 500 mg L<sup>-1</sup> y dos controles (sin sonicar y sonicado), en el crecimiento, desarrollo y la absorción mineral en plantas de tomate sin estrés salino (Sin NaCl) y con estrés salino (50 mM NaCl). La aplicación de GP y CNT en plantas sin estrés salino no afectó la mayoría de los parámetros morfológicos, como el peso promedio de frutos y el rendimiento. Las biomásas frescas y secas tanto de raíz como de parte aérea fueron modificadas por los nanomateriales de carbono (CNMs). Por otro lado, la altura de las plantas bajo salinidad aumentó significativamente con el tratamiento de GP y CNT en la dosis más baja (50 mg L<sup>-1</sup>). Mientras que el DT disminuyó notablemente. El número de frutos con pudrición apical y el porcentaje de daño fueron similares a los controles. Además, el tratamiento con GP y CNT modificó la concentración de macro y micro nutrientes en las hojas y frutos de las plantas de tomate. La aplicación de GP y CNT a las semillas en sus diferentes

#### \*Corresponding Author:

Antonio Juárez-Maldonado. Departamento de Botánica, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. E-mail: [antonio.juarez@uaaan.edu.mx](mailto:antonio.juarez@uaaan.edu.mx)

mg L<sup>-1</sup>). While the DT decreased notably. The number of fruits with blossom end rot and the percentage fruits with damage were similar to the controls. In addition, treatment with GP and CNT modified the concentration of macro and micro nutrients in the leaves and fruits of tomato plants. The application of GP and CNT to the seeds in their different concentrations can generate positive responses in the development and growth of the plants, it has positive effects and under conditions of saline stress they can induce beneficial responses by improving the absorption of nutrients.

---

## KEY WORDS

---

Graphene, carbon nanotubes, salinity, macronutrients, micronutrients.

---

## Introduction

The salinization of soil and water resources is increasing due to the irrational use of agricultural inputs to increase agricultural production (Arif *et al.*, 2020; Phogat *et al.*, 2020). Worldwide, salinity induces abiotic stress that affects between a quarter and a third of crop productivity (Munns *et al.*, 2019). Approximately 10 % of the world's land surface and 50 % of irrigated areas are exposed to salinity, causing a loss of approximately USD\$12 billion in the agricultural sector (Kamran *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020). A soil with an electrical conductivity of 4 dS m<sup>-1</sup> (approximately 40 mM NaCl), an osmotic stress of 0.2 MPa, and a percentage of exchangeable sodium of 15 % to 25 % is called a salt-affected soil (Kosová *et al.*, 2013).

Salinity induces a wide spectrum of physiological (stomatal conductance, transpiration rate and photosynthesis), biometric (height, leaf area, biomass production) and biochemical (antioxidant enzymes) alterations, and can cause ionic stress, osmotic stress and oxidative stress in the plants (Machado-Guimarães *et al.*, 2020). Ionic stress is caused by a greater accumulation of salt ions in plant cells at toxic levels, and osmotic stress is caused by a decrease in the osmotic potential of water, in addition ionic stress causes a deficiency of nutrients, disturbs the balance of reactive oxygen species (ROS) in plant cells, which directly causes oxidative stress (Hernández, 2019; Wani *et al.*, 2020).

concentraciones puede generar respuestas positivas en el desarrollo y crecimiento de las plantas, y bajo condiciones de estrés salino pueden inducir respuestas benéficas al mejorar la absorción de los nutrientes.

---

## PALABRAS CLAVE

---

Grafeno, nanotubos de carbono, salinidad, macronutrientes, micronutrientes.

---

## Introducción

La salinización de los recursos de suelo y agua va en aumento debido al uso irracional de insumos agrícolas para incrementar la producción agrícola (Arif *et al.*, 2020; Phogat *et al.*, 2020). A nivel mundial, la salinidad induce un estrés de tipo abiótico que afecta entre un cuarto y un tercio de la productividad de los cultivos (Munns *et al.*, 2019). Aproximadamente el 10 % de la superficie terrestre mundial y el 50 % de las áreas irrigadas están expuestas a la salinidad, lo que provoca una pérdida de aproximadamente 12 mil millones de dólares en el sector agrícola (Kamran *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020). Un suelo con una conductividad eléctrica de 4 dS m<sup>-1</sup> (aproximadamente 40 mM NaCl), un estrés osmótico de 0.2 MPa y un porcentaje de sodio intercambiable de 15 % a 25 % se denomina suelo afectado por sal (Kosová *et al.*, 2013).

La salinidad induce un amplio espectro de alteraciones fisiológicas (conductancia estomatosa, tasa de transpiración y fotosíntesis), biométricas (altura, área foliar, producción de biomasa) y bioquímicas (enzimas antioxidantes), y puede provocar estrés iónico, estrés osmótico y estrés oxidativo en las plantas (Machado-Guimarães *et al.*, 2020). El estrés iónico es causado por una mayor acumulación de iones de sal en las células de la planta a niveles tóxicos, y el estrés osmótico es causado por una disminución en el potencial osmótico del agua, además el estrés iónico provoca una deficiencia de nutrientes, perturba el equilibrio de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células de las plantas, lo que causa directamente el estrés oxidativo (Hernández, 2019; Wani *et al.*, 2020).

Los nutrientes minerales como nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), zinc (Zn) y boro (B), entre otros, son esenciales para la productividad del cultivo en condiciones de estrés salino (Zörb *et al.*, 2019). Por lo que una

Mineral nutrients such as nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), sulfur (S), zinc (Zn) and boron (B), among others, are essential for crop productivity under saline stress conditions (Zörb *et al.*, 2019). Therefore, a deficiency of these nutrients is an additional problem since it includes a lower accumulation of biomass, a greater susceptibility to pathogens and diseases, and a delay in plant growth directly related to crop yield (Farooq *et al.*, 2017). It should be mentioned that plants are inherently dynamic and flexible in their metabolism, which can promote adaptation to saline environments (Arsova *et al.*, 2019). To do this, they depend on signals and pathways that restore the homeostasis of ionic, osmotic and ROS species (Ma & Yan, 2018; Sewelam *et al.*, 2016).

On the other hand, the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is a member of the Solanaceae family and is the most valuable crop in the world (Kayess *et al.*, 2020), for being rich in antioxidant molecules such as carotenoids, vitamin E, vitamin C and phenolic compounds, mainly flavonoids (Devkar *et al.*, 2019). It is considered moderately sensitive to saline stress, so this stress represents a substantial threat to its production, due to the negative effects caused (Kashyap *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020).

In this context, advances in nanotechnology provide novel tools for the agri-food sector, one of these tools is nanomaterials (NMs). The use of NMs in agricultural crops produces morphological, physiological and biochemical responses that can help the plant to tolerate some type of stress, be it biotic or abiotic, by generating changes in the transcriptome, proteome, metabolome and ionome (Wang *et al.*, 2019), they can also improve the absorption of water and nutrients (Sanzari *et al.*, 2019). Recently, carbon-based nanomaterials (CNMs) have been applied as plant growth regulators, pest control agents, nanosensors for pest detection, and nutrient carriers in agriculture (Mukherjee *et al.*, 2016). This is due to the translocation capacity that depends on their size and surface charge (negative charge), promoting a series of physiological and biochemical responses that improve plant growth and crop protection (Joshi *et al.*, 2020). The efficacy of a particular type of CNMs varies from plant to plant and the outcome (null, beneficial, or adverse) of CNMs-

deficiencia de éstos nutrientes es un problema adicional ya que incluye una menor acumulación de biomasa, una mayor susceptibilidad a patógenos y enfermedades, y un retraso en el crecimiento de las plantas directamente relacionado con el rendimiento de los cultivos (Farooq *et al.*, 2017). Cabe mencionar, que las plantas son inherentemente dinámicas y flexibles en su metabolismo, lo que puede propiciar una adaptación a ambientes salinos (Arsova *et al.*, 2019). Para ello, dependen de señales y vías que restablezcan la homeostasis de las especies iónicas, osmóticas y ROS (Ma & Yan, 2018; Sewelam *et al.*, 2016).

Por otro lado, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es miembro de la familia de las solanáceas y es el cultivo de mayor valor en el mundo (Kayess *et al.*, 2020), por ser rico en moléculas antioxidantes como carotenoides, vitamina E, vitamina C y compuestos fenólicos, principalmente flavonoides (Devkar *et al.*, 2019). Se considera moderadamente sensible al estrés salino, por lo que dicho estrés representa una amenaza sustancial para su producción, debido a los efectos negativos ocasionados (Kashyap *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020).

En este contexto, los avances de la nanotecnología proporcionan herramientas novedosas para el sector agroalimentario, una de éstas herramientas son los nanomateriales (NMs). El uso de los NMs en los cultivos agrícolas, producen respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que pueden ayudar a la planta a tolerar algún tipo de estrés ya sea de tipo biótico o abiótico, al generar cambios en el transcriptoma, proteoma, metaboloma e ionoma (Wang *et al.*, 2019). Además puede mejorar la absorción de agua y nutrientes (Sanzari *et al.*, 2019). Recientemente, los nanomateriales a base de carbono (CNMs) se han aplicado como reguladores del crecimiento de las plantas, agentes de control de plagas, nanosensores para la detección de plagas y portadores de nutrientes en la agricultura (Mukherjee *et al.*, 2016). Esto se debe a la capacidad de translocación que depende del tamaño y la carga superficial de los mismos (carga negativa), promoviendo una serie de respuestas fisiológicas y bioquímicas que mejoran el crecimiento de la planta y la protección de los cultivos (Joshi *et al.*, 2020). La eficacia de un tipo particular de CNMs varía de una planta a otra y el resultado (nulo, beneficioso, o adverso) de las interacciones CNMs-planta, depende de la carga, tamaño, forma, concentración, cantidad y tiempo de exposición (Verma *et al.*, 2019). Dentro

plant interactions depends on the load, size, shape, concentration, amount and time of exposure (Verma *et al.*, 2019). These CNMs include single-walled (SWCNT) and multiple-walled (MWCNT) carbon nanotubes (CNT), as well as graphene (GP), which have been applied to improve plant growth (Husen & Siddiqi, 2014).

Some of these CNMs have been used in seed treatment and have a positive impact on improving plant growth (Ratnikova *et al.*, 2015), ranging from improved seed germination to increased productivity and crop yield (Gao *et al.*, 2020). It has been reported that the treatment of seeds through the imbibition with some CNMs, such as CNT, can break the seed coat and create pores to enter the seed (Khodakovskaya *et al.*, 2009; Ratnikova *et al.*, 2015). Gilbertson *et al.* (2020), mention that at low concentrations, they activate the aquaporin channel and promote the absorption of water and nutrients. On the contrary, in high doses, they promote the production of free radicals that induce oxidative stress and cell damage (Samadi *et al.*, 2021).

In this sense, the direct exposure of the seeds with CNMs can break the dormancy of the seeds and improve their germination, since it induces an abrasion of the endocarp and increases the infiltration of oxygen and humidity (Sayedena *et al.*, 2018). Joshi *et al.* (2018), reported faster growth and improvements in wheat crop yield when treating the seeds with MWCNT (0, 70, 80 and 90 mg L<sup>-1</sup>) due to better absorption of water and essential minerals such as P and K. Another study mentions that rice plants treated with MWCNT (70, 80 and 90 mg L<sup>-1</sup>) from the seed, have a faster growth, and also a better absorption of water and nutrients, which is why an increase in crop yield (Joshi *et al.*, 2020). With this, it is assumed that the application of CNMs in the seed can improve the physiology of the plant and also function as elicitors to induce tolerance to stress, in this case stress by NaCl. With the above, the present study aims to evaluate different concentrations of GP and CNT in growth and mineral absorption of nutrients in tomato plants grown under saline stress conditions.

## Material and Methods

### Vegetal material

The seeds used in the present study were hybrid

de estos CNMs destacan los nanotubos de carbono (CNT) de pared simple (SWCNT) y de pared múltiple (MWCNT), así como el grafeno (GP), los cuales se han aplicado para mejorar el crecimiento de las plantas (Husen & Siddiqi, 2014).

Algunos de éstos CNMs se han utilizado en el tratamiento de semillas y tienen un impacto positivo en la mejora del crecimiento de las plantas (Ratnikova *et al.*, 2015), que van desde el mejoramiento en la germinación de semillas hasta el incremento en la productividad y el rendimiento de los cultivos (Gao *et al.*, 2020). Se ha reportado que el tratamiento de semillas a través de la imbibición con algunos CNMs, como los CNT, pueden romper la testa de la semilla y crear poros para ingresar dentro de la semilla (Khodakovskaya *et al.*, 2009; Ratnikova *et al.*, 2015). Gilbertson *et al.* (2020), mencionan que a bajas concentraciones, activan el canal de acuaporinas y se promueve la absorción de agua y nutrientes. Por el contrario, en dosis altas, promueven la producción de radicales libres que inducen un estrés oxidativo y daño celular (Samadi *et al.*, 2021).

En este sentido, la exposición directa de las semillas con los CNMs puede romper la latencia de las semillas y mejorar la germinación de las mismas, ya que induce una abrasión del endocarpio y aumenta la infiltración de oxígeno y humedad (Sayedena *et al.*, 2018). Joshi *et al.* (2018), reportaron un crecimiento más rápido y mejoras en el rendimiento del cultivo de trigo al tratar las semillas con MWCNT (0, 70, 80 y 90 mg L<sup>-1</sup>) debido a una mejor absorción de agua y minerales esenciales como P y K. Otro estudio menciona que las plantas de arroz tratadas con MWCNT (70, 80 y 90 mg L<sup>-1</sup>) desde la semilla, tienen un crecimiento más rápido, y además una mejor absorción de agua y nutrientes, por lo que se obtiene un incremento en el rendimiento del cultivo (Joshi *et al.*, 2020). Con esto, se asume que la aplicación de CNMs en la semilla puede mejorar la fisiología de la planta y además funcionar como elicitors para inducir tolerancia a un estrés, en este caso estrés por NaCl. Con lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo de evaluar diferentes concentraciones de GP y CNT en el crecimiento y la absorción mineral de nutrientes en plantas de tomate cultivadas bajo condiciones de estrés salino.

## Materiales y Métodos

### Material vegetal

Las semillas utilizadas en el presente estudio fueron de tomate híbrido "Pony Express F1" (Harris Moran, Davis, CA, USA), tipo saladette y crecimiento determinado.

tomato "Pony Express F1" (Harris Moran, Davis, CA, USA), saladette type and determined growth.

### Carbon nanomaterials

The CNMs used were: carbon nanotubes (CNT) and graphene (GP). The CNT were multilayer, 95 % pure, 30-50 nm in diameter, and 10-20  $\mu\text{m}$  long (Nanostructured & Amorphous Materials, Inc.). Graphene (GP) has a purity of 97 %, a diameter of 2  $\mu\text{m}$ , a thickness of 8 to 12 nm and with 10-12 layers (Cheap Tubes Inc.).

### Seed treatment

The treatments consisted of three different concentrations: 50, 250 and 500  $\text{mg L}^{-1}$  of GP and CNT, respectively. These concentrations were selected in a range of low, medium and high doses, according to the results obtained in the growth and development of tomato plants carried out in a previous study with the same CNMs (López-Vargas *et al.*, 2020). The treatment solutions were prepared in 50 ml beakers, which contained 20 ml of each treatment and 40 tomato seeds in each glass, subsequently they were sonicated for 10 minutes at a vibration amplitude of 60 % at 20 Khz in a ultrasonicator (Q500 sonicator, QSONICA, Melville, NY, USA), similar to that reported by Ratnikova *et al.* (2015). The treated seeds were stored at room temperature ( $25 \pm 1$  °C) with 16 hours of light and 8 hours of darkness for 24 hours in glass jars with a lid and shaken every 8 hours to avoid the precipitation of CNMs and ensure the imbibition in the seeds (Ratnikova *et al.*, 2015). Two controls containing distilled water with non-sonicated seeds (Non-sonicated Control) and distilled water with sonicated seeds (Sonicated Control) were also evaluated.

### Crop development

After 24 hours, the sowing of the treated seeds was carried out in previously labeled polystyrene trays. The transplant was carried out 30 days after sowing (das) in black polyethylene bags with a capacity of 14 L. The substrate used was a mixture of perlite-peat moss in a 1:1 ratio. The experiment was divided into two (experiment 1 and experiment 2) and they were established separately: 16 plants were transplanted for each treatment for experiment 1 and 16 plants per treatment for experiment 2, considering one plant as an experimental unit (Table 1). The irrigation system was directed, at 8 days after transplantation (dat),

### Nanomateriales de carbono

Los CNMs utilizados fueron: nanotubos de carbono (CNT) y grafeno (GP). Los CNT fueron multicapa, con una pureza de 95 %, un diámetro de 30-50 nm y de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de largo (Nanostructured & Amorphous Materials, Inc.). El grafeno (GP) tiene una pureza del 97 %, un diámetro de 2  $\mu\text{m}$ , un grosor de 8 a 12 nm y con 10-12 capas (Cheap Tubes Inc.).

### Tratamiento de semillas

Los tratamientos consistieron en tres diferentes concentraciones: 50, 250 y 500  $\text{mg L}^{-1}$  de GP y CNT, respectivamente. Éstas concentraciones fueron seleccionadas en un rango de dosis baja, media y alta, de acuerdo a los resultados obtenidos en el crecimiento y desarrollo de las plantas de tomate realizados en un estudio previo con los mismos CNMs (López-Vargas *et al.*, 2020). Las soluciones de los tratamientos fueron preparadas en vasos de precipitados de 50 ml, que contenían 20 ml de cada tratamiento y 40 semillas de tomate en cada vaso, posteriormente fueron sonicadas por 10 minutos a una amplitud de vibración de 60 % a 20 Khz en un ultrasonificador (sonicador Q500, QSONICA, Melville, NY, EE. UU.), similar a lo reportado por Ratnikova *et al.* (2015). Las semillas tratadas fueron almacenadas a temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C) con 16 h de luz y 8 de oscuridad durante 24 h en frascos de vidrio con tapa y agitados cada 8 hrs para evitar la precipitación de los CNMs y asegurar la imbibición en las semillas (Ratnikova *et al.*, 2015). También se evaluaron dos controles que contenían agua destilada con semillas sin sonicar (Control no sonicado) y agua destilada con semillas sonicadas (Control sonicado).

### Desarrollo del cultivo

Transcurrida las 24 horas, la siembra de las semillas tratadas fue realizada en charolas de poliestireno previamente etiquetadas. El trasplante fue realizado a los 30 días después de la siembra (das) en bolsas de polietileno color negro con capacidad de 14 L. El sustrato utilizado fue una mezcla de perlita-peat moss en proporción 1:1. El experimento se dividió en dos (experimento 1 y experimento 2) y fueron establecidos por separado: se trasplantaron 16 plantas por cada tratamiento para el experimento 1 y 16 plantas por tratamiento para el experimento 2, considerando una planta como unidad experimental (Tabla 1). El sistema de riego fue dirigido, a los 8 días después del trasplante (dat), las plantas del experimento 1 fueron irrigadas con solución nutritiva Steiner (1961) y las plantas del experimento 2 fueron irrigadas con solución nutritiva Steiner combinada con 50

**Table 1.**  
**Treatments with GP, CNT and NaCl to tomato seeds.**

**Tabla 1.**  
**Tratamientos con GP, CNT y NaCl a semillas de tomate.**

Treatment	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Experiment 1	Experiment 2
Non-sonicated control	0	Without NaCl	50 mM NaCl
Sonicated control	0	Without NaCl	50 mM NaCl
GP	50	Without NaCl	50 mM NaCl
	250	Without NaCl	50 mM NaCl
	500	Without NaCl	50 mM NaCl
CNT	50	Without NaCl	50 mM NaCl
	250	Without NaCl	50 mM NaCl
	500	Without NaCl	50 mM NaCl

the plants of experiment 1 were irrigated with Steiner nutrient solution (1961) and the plants of experiment 2 were irrigated with Steiner nutrient solution combined with 50 mM of chloride of sodium (NaCl), these solutions were prepared in different tanks with a capacity of 1100 L. The electrical conductivity (EC) of the solutions was monitored during the cycle and these ranged between 1.9-2.5 dS m<sup>-1</sup> for the normal Steiner solution and 5.5-7.5 dS m<sup>-1</sup> for the Steiner solution with NaCl. The pH was adjusted to 6.5 with concentrated sulfuric acid in both tanks to favor the absorption of nutrients. The crop was managed to a single stem, and it developed for 160 dat.

#### Evaluation of agronomic parameters

For the evaluation of the growth and development of tomato plants, measurements were made at 15, 30, 45, 60 and 75 days after the application of NaCl. The height of the plant was measured with a flexometer, the diameter of the stem was determined with a digital vernier; in addition, the number of leaves, number of clusters, number of fruits per plant, were counted. In the case of plants developed with NaCl, the number of fruits damaged with blossom end rot was counted for each plant to determine the percentage of damage, and yield was evaluated. The fresh biomass of the aerial part and root (g) was determined using a digital scale (OHAUS model Adventurer Pro). The dry biomass was obtained by drying the samples in a Drying Oven (model DHG9240A) for 72 hours at a constant temperature of 70 °C.

mM de cloruro de sodio (NaCl), dichas soluciones fueron preparadas en tinacos diferentes con capacidad de 1100 L. La conductividad eléctrica (CE) de las soluciones fue monitoreada durante el ciclo y éstas oscilaban entre 1.9-2.5 dS m<sup>-1</sup> para la solución Steiner normal y 5.5-7.5 dS m<sup>-1</sup> para la solución Steiner con NaCl. El pH se ajustó a 6.5 con ácido sulfúrico concentrado en ambos tinacos para favorecer la absorción de nutrimentos. El cultivo fue manejado a un solo tallo, y se desarrolló por 160 dat.

#### Evaluación de parámetros agronómicos

Para la evaluación del crecimiento y desarrollo de las plantas de tomate, se realizaron mediciones a los 15, 30, 45, 60 y 75 días después de la aplicación de NaCl. La altura de la planta se midió con un flexómetro, el diámetro de tallo fue determinado con un vernier digital, además, el número de hojas, número de racimos, número de frutos por planta, fueron contabilizados. En el caso de las plantas desarrolladas con NaCl, se contabilizó el número de frutos dañados con pudrición apical ("blossom end rot") por cada planta para determinar el porcentaje de daño, y se evaluó rendimiento. La biomasa fresca de parte aérea y raíz (g), fue determinada utilizando una balanza digital (OHAUS modelo Adventurer Pro). La biomasa seca se obtuvo al secar las muestras en una estufa de secado marca Drying Oven modelo DHG9240A durante 72 h a una temperatura constante de 70 °C.

#### Contenido mineral

El contenido de macronutrientes (P, K, Ca, Mg, S y Na) y micronutrientes (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo y B) en hojas

### Mineral content

The content of macronutrients (P, K, Ca, Mg, S and Na) and micronutrients (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo and B) in leaves and fruits was determined with a plasma emission spectrophotometer (Optima 8300 ICP-OES Optical System, PerkinElmer, MA, USA) following the methodology described by Hernández-Hernández *et al.*, (2018). For the analysis of dry tissue of leaves and fruits, 1 g of each sample was taken, which were digested in 30 ml of nitric acid at 300 °C for 6 hours, and volumetric to 50 ml with deionized water for subsequent analysis.

### Statistical analysis

The experiment was set up in a completely randomized design. Statistical analysis was performed independently for each experiment. In the agronomic variables, 16 repetitions per treatment were considered. For the physicochemical and biochemical variables, six repetitions per treatment were considered. The analysis of variance and the Fisher LSD test of means ( $\alpha=0.05$ ) was performed in the Infostat software (v2018) (<https://www.infostat.com.ar>).

## Results

### Agronomic variables

The addition of GP and CNT in the plants without salt stress did not affect the height of the plants (Figure 1A). Under saline stress, the different doses of GP and CNT applied to the plants did not affect the height of the plants, since the treatments were similar to the non-sonicated control. However, when compared with the sonicated control, the height of the plants was favored with the addition of GP at 50 and 250 mg L<sup>-1</sup>, presenting an increase of 11.04 % and 12.47 %, respectively, and 11.34 % with the application of CNT at 250 mg L<sup>-1</sup> (Figure 1A).

The stem diameter of the plants without salinity increased 4.57 % and 9.76 % with CNT at 50 and 250 mg L<sup>-1</sup>, respectively, compared to the non-sonicated control. No concentration of GP affected this variable. However, when comparing the treatments with the sonicated control, the stem diameter decreased with the addition of GP in its different doses (10.60 %, 7.26 % and 6.53 %, respectively). Similarly, CNT decreased this variable with doses of 50 and 500 mg L<sup>-1</sup> (4.73 % and 6.20 %, respectively) (Figure 1B). It

and fruits was determined with an emission spectrophotometer of plasma (Optima 8300 ICP-OES Optical System, PerkinElmer, MA, USA) following the methodology described by Hernández-Hernández *et al.* (2018). For the analysis of dry tissue of leaves and fruits, 1 g of each sample was taken, which were digested in 30 ml of nitric acid at 300 °C for 6 hours, and volumetric to 50 ml with deionized water for subsequent analysis.

### Análisis estadístico

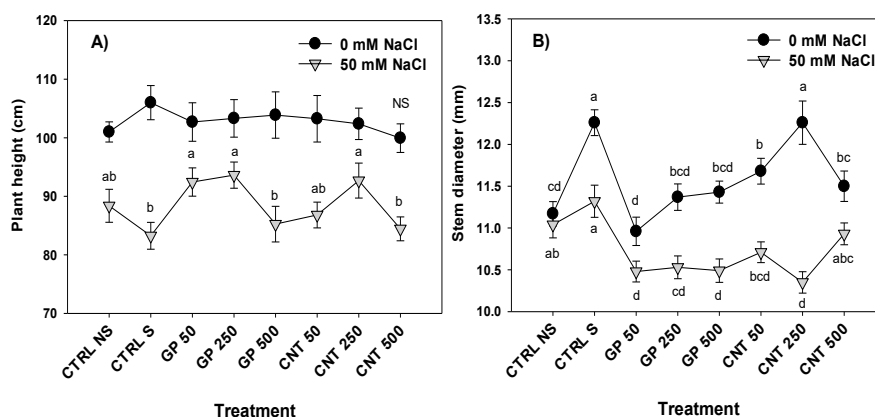
El experimento se estableció en un diseño completamente aleatorizado. El análisis estadístico se realizó de manera independiente para cada experimento. En las variables agronómicas se consideraron 16 repeticiones por tratamiento. Para las variables fisicoquímicas y bioquímicas se consideraron seis repeticiones por tratamiento. El análisis de varianza y la prueba de medias Fisher LSD ( $\alpha=0.05$ ) se realizó en el software Infostat (v2018) (<https://www.infostat.com.ar>).

## Resultados

### Variables agronómicas

La adición de GP y CNT en las plantas sin estrés salino no afectó la altura de las plantas (Figura 1A). Bajo estrés salino, las diferentes dosis de GP y CNT aplicadas a las plantas no afectaron la altura de las plantas, ya que los tratamientos fueron similares al control no sonificado. Sin embargo, al compararlos con el control sonificado, la altura de las plantas se vio favorecida con la adición de GP a 50 y 250 mg L<sup>-1</sup> presentando un incremento de 11.04 % y 12.47 %, respectivamente, y 11.34 % con la aplicación de CNT a 250 mg L<sup>-1</sup> (Figura 1A).

El diámetro de tallo de las plantas sin salinidad se incrementó 4.57 % y 9.76 % con CNT a 50 y 250 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, en comparación con el control no sonificado. Ninguna concentración de GP afectó esta variable. No obstante, al comparar los tratamientos con el control sonificado, disminuyó el diámetro de tallo con la adición de GP en sus diferentes dosis (10.60 %, 7.26 % y 6.53 %, respectivamente). De igual manera los CNT disminuyeron esta variable con las dosis de 50 y 500 mg L<sup>-1</sup> (4.73 % y 6.20 %, respectivamente) (Figura 1B). Cabe mencionar que al comparar ambos controles se observó que el proceso de sonificado induce un



**Figure 1. Plant height (A) and stem diameter (B) of plants treated with CNMs and NaCl. Different letters indicate significant difference between treatments according to LSD Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). ns: not significant;  $n = 16 \pm$  standard error.**

**Figura 1. Altura de planta (A) y diámetro de tallo (B) de las plantas tratadas con CNMs y NaCl. Diferentes letras indican diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo a LSD Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). ns: no significativo;  $n = 16 \pm$  error estándar.**

is worth mentioning that when comparing both controls, it was observed that the sonication process induces an increase in the stem diameter of 9.76 %. While the stem diameter of the plants with salinity decreased with the addition of GP in its different doses in a range of 4.62-5.07 %, in comparison with the non-sonicated control; and in a range of 6.98-7.42 % compared to the sonicated control. The addition of CNT at 250 mg L<sup>-1</sup> decreased 6.25 % and 8.57 % compared to both controls, respectively (Figure 1B).

The average weight of the fruits (Figure 2A) as well as the fruit yield per plant (Figure 2B) were not affected by the addition of GP and CNT in plants without saline stress and nor with saline stress. However, a slight increase of around 8.5 % can be observed in the yield and average fruit weight of the plants stressed by salinity with the GP treatment at 50 mg L<sup>-1</sup> compared to the non-sonicated control.

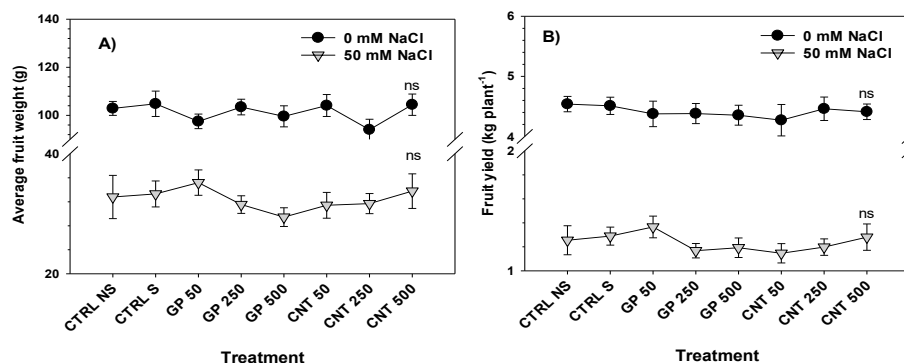
The number of fruits damaged by blossom end rot in plants under saline stress did not show differences between treatments (Figure 3). Similarly, the percentage (%) of fruits damaged per plant was not affected when compared with both controls (Figure 3). However, it is observed that the GP treatment at 500 mg L<sup>-1</sup> presented the lowest percentage and the lowest number of damaged fruits in plants under saline stress.

incremento del diámetro de tallo de 9.76 %. Mientras que el diámetro de tallo de las plantas con salinidad disminuyó con la adición de GP en sus diferentes dosis en un rango de 4.62-5.07 %, en comparación con el control no sonicado; y en un rango de 6.98-7.42 % en comparación con el control sonicado. La adición de CNT a 250 mg L<sup>-1</sup> disminuyó 6.25 % y 8.57 % en comparación con ambos controles, respectivamente (Figura 1B).

El peso promedio de los frutos (Figura 2A) así como el rendimiento de frutos por planta (Figura 2B) no fueron afectados por la adición de GP y CNT en plantas sin estrés salino y ni con estrés salino. Sin embargo, se puede observar un ligero incremento de alrededor del 8.5 %, en el rendimiento y peso promedio de fruto de las plantas estresadas por salinidad con el tratamiento GP a 50 mg L<sup>-1</sup> en comparación al control no sonicado.

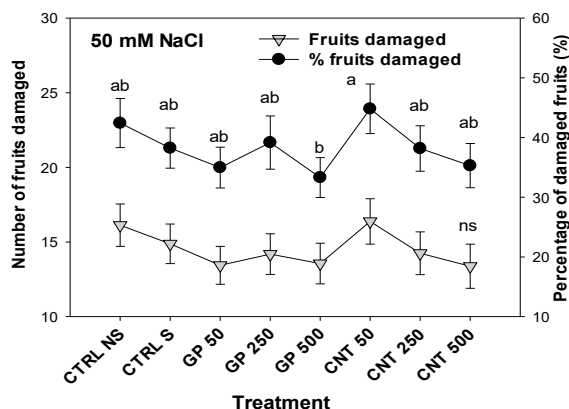
El número de frutos dañados por pudrición apical en las plantas bajo estrés salino no presentó diferencias entre tratamientos (Figura 3). De igual manera el porcentaje (%) de frutos dañados por planta no fue afectado al ser comparados con ambos controles (Figura 3). Sin embargo, se observa que el tratamiento GP a 500 mg L<sup>-1</sup> presentó el menor porcentaje y menor número de frutos dañados en plantas bajo estrés salino.





**Figure 2. Average fruit weight (A) and fruit yield (B) of plants treated with CNMs and NaCl.** Different letters indicate significant difference between treatments according to LSD Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). ns: not significant;  $n = 16 \pm$  standard error.

**Figura 2. Peso promedio de frutos (A) y rendimiento de frutos (B) de las plantas tratadas con CNMs y NaCl.** Diferentes letras indican diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo a LSD Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). ns: no significativo;  $n = 16 \pm$  error estándar.

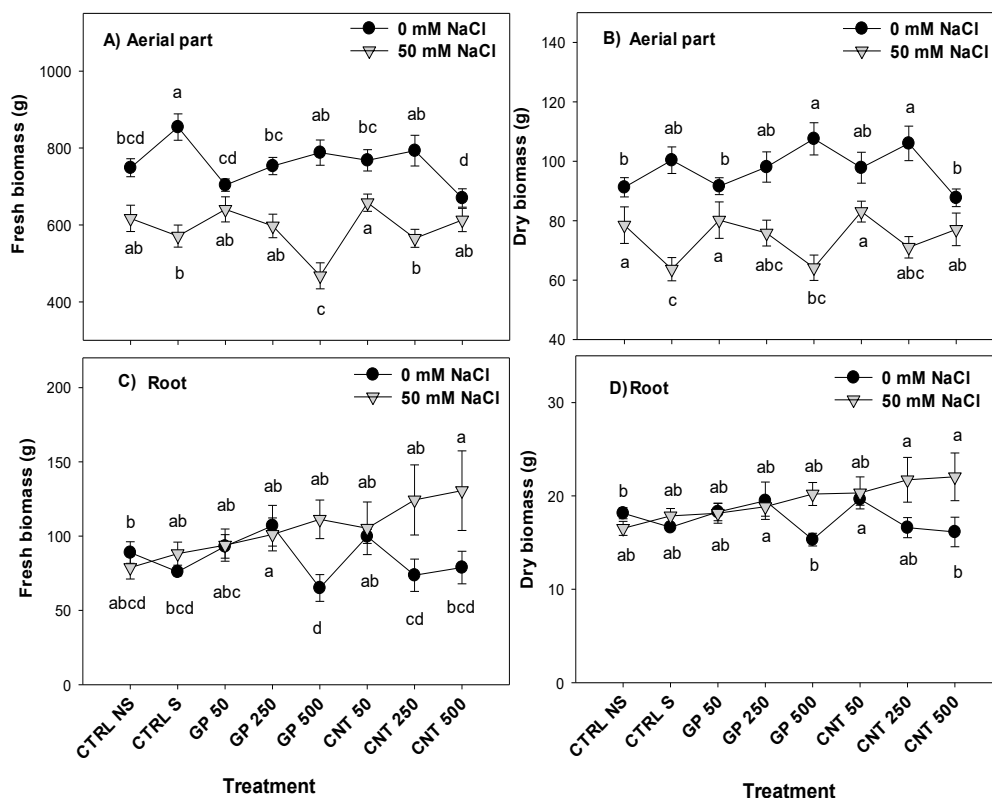


**Figure 3. Number of fruits damaged by blossom end rot and percentage of damaged fruits (%) of plants treated with CNMs and NaCl.** Different letters indicate significant difference between treatments according to LSD Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). ns: not significant;  $n = 16 \pm$  standard error.

**Figura 3. Número de frutos dañados por pudrición apical y porcentaje de frutos dañados (%) de las plantas tratadas con CNMs y NaCl.** Diferentes letras indican diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo a LSD Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). ns: no significativo;  $n = 16 \pm$  error estándar.

The fresh air weight (FAW) of the plants without saline stress did not present significant differences between treatments. However, the sonicating process increased the FAW by 14.12 %, compared to not sonicating. Furthermore, the application of CNT at 500 mg L<sup>-1</sup> showed a decrease in FAW of 21.58 % compared to the sonicated control (Figure 4A). In plants with salt stress, the addition of GP at 500 mg L<sup>-1</sup> decreased FAW by 24.20 % compared to the non-

El peso fresco aéreo (FAW) de las plantas sin estrés salino no presentó diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, el proceso de sonicado incrementó el FAW en un 14.12 %, en comparación a no sonicar. Además, la aplicación de CNT a 500 mg L<sup>-1</sup> presentó la una disminución del FAW de 21.58 % en comparación al control sonicado (Figura 4A). En las plantas con estrés salino, la adición de GP a 500 mg L<sup>-1</sup> disminuyó 24.20 % el PFA comparado con



**Figure 4. Fresh (A, C) and dry (B, D) biomass of aerial part (A, B) and root (C, D) of plants treated with CNMs and NaCl.** Different letters indicate significant difference between treatments according to LSD Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). ns: not significant; n = 16 ± standard error.

**Figura 4. Biomasa fresca (A, C) y seca (B, D) de parte aérea (A, B) y raíz (C, D) de las plantas tratadas con CNMs y NaCl.** Diferentes letras indican diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo a LSD Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). ns: no significativo; n = 16 ± error estándar.

sonicated control and 18.09 % compared to the sonicated control. The CNT treatment at 50 mg L<sup>-1</sup> increased FAW 15.20 % compared to the sonicated control (Figure 4A).

The aerial dry weight (ADW) of the plants without saline stress increased with the GP and CNT treatments at 500 and 250 mg L<sup>-1</sup> by 17.87 % and 16.20 %, respectively, compared to the non-sonicated control (Figure 4 B). In plants with salt stress, ADW decreased 18.24 % with the GP treatment at 500 mg L<sup>-1</sup> and 18.87 % with the sonicated control, compared to the non-sonicated control (Figure 4B).

The addition of GP and CNT to the plants without saline stress did not affect the fresh weight (FWR) or dry weight

el control no sonificado y 18.09 % comparado con el control sonificado. El tratamiento CNT a 50 mg L<sup>-1</sup> incrementó 15.20 % el FAW en comparación con el control sonificado (Figura 4A).

El peso seco aéreo (ADW) de las plantas sin estrés salino se incrementó con los tratamientos GP y CNT a 500 y 250 mg L<sup>-1</sup> en 17.87 % y 16.20 %, respectivamente, en comparación con el control no sonificado (Figura 4B). En las plantas con estrés salino, el ADW disminuyó 18.24 % con el tratamiento de GP a 500 mg L<sup>-1</sup> y 18.87 % con el control sonificado, en comparación con el control no sonificado (Figura 4B).

La adición de GP y CNT a las plantas sin estrés salino no afectó el peso fresco (FWR) o seco de raíz (DWR) (Figura

root (DWR) (Figure 4). However, under saline stress, the FWR and DWR increased with the application of CNT, especially with CNT at 500 mg L<sup>-1</sup> with 65.69 % more FWR and 33.48 % more DWR compared to the non-sonicated control (Figure 4).

#### Nutrient content in tomato leaves and fruits

The macronutrient content in the different organs of tomato plants treated with CNMs combined with saline stress (0 and 50 mM NaCl) was different. In the P content in the leaves, no effect was had by the application of CNMs in any condition of saline stress (Figure 5A). In the fruits of plants without saline stress, the P presented a decrease with the application of the CNMs, especially with the GP and CNT treatments at 500 and 250 mg L<sup>-1</sup>, respectively. However, in the fruits of plants with saline stress, the P content was not affected by the treatments (Figure 5B). Whereas saline stress consistently negatively influences the P content in leaves and fruits (Figure 5A and B).

The K content in plant leaves without saline stress increased by 22.84 % and 28.61 % with CNT at 250 and 500 mg L<sup>-1</sup> compared to the non-sonicated control. Under saline stress, the CNT treatment at 250 mg L<sup>-1</sup> induced the greatest increase in K in the leaves, 40.75 % more than the non-sonicated control (Figure 5C). In the fruits of plants without saline stress, a decrease in K was observed with the GP and CNT treatments at 500 and 250 mg L<sup>-1</sup>, being 24.98 % and 27.79 % less than the sonicated control. In the fruits of plants with saline stress there were no differences between treatments (Figure 5D).

The Ca content was only affected by the CNMs in the fruits of plants without saline stress, where a decrease was observed with the GP and CNT treatments at 500 and 250 mg L<sup>-1</sup> (34.45 % and 37.81 %, respectively, compared to the non-sonicated control) (Figure 5F). The Ca content in the leaves did not showed differences between treatments (Figure 5E).

The Mg content in plant leaves without saline stress increased by 52.87 % and 49.71 %, with the GP and CNT treatments at 50 mg L<sup>-1</sup>, respectively, compared to the sonicated control. Under saline stress, no differences were observed between treatments (Figure 5G). In the fruits of plants without saline stress it was observed that the GP treatments at 500 mg L<sup>-1</sup> and CNT at 250 and 500 mg L<sup>-1</sup>,

4). Sin embargo, bajo estrés salino en el FWR y DWR se observó un incremento con la aplicación de CNT, sobre todo con CNT a 500 mg L<sup>-1</sup> con un 65.69 % más FWR y 33.48 % más DWR en comparación con el control no sonificado (Figura 4).

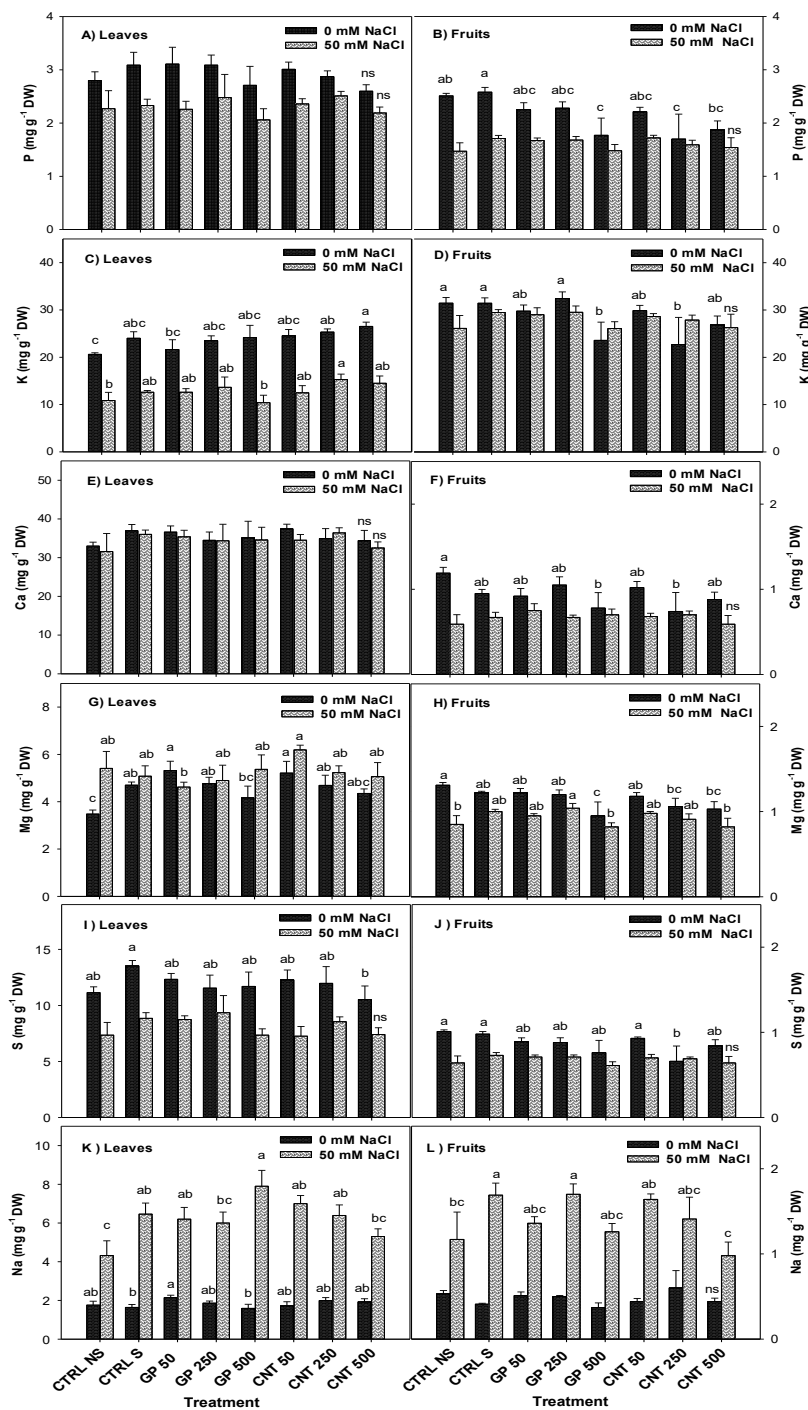
#### Contenido de nutrientes en hojas y frutos de tomate

El contenido de macronutrientes en los diferentes órganos de las plantas de tomate tratadas con CNMs combinados con estrés salino (0 y 50 mM NaCl) fue diferente. En el contenido de P en las hojas no se tuvo efecto por la aplicación de CNMs en ninguna condición de estrés salino (Figura 5A). En los frutos de plantas sin estrés salino, el P presentó una disminución con la aplicación de los CNMs, sobre todo con los tratamientos GP y CNT a 500 y 250 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Sin embargo, en los frutos de plantas con estrés salino no se afectó el contenido de P por los tratamientos (Figura 5B). Mientras que el estrés salino consistentemente influye negativamente en el contenido de P en hojas y frutos (Figuras 5A y B).

El contenido de K en hojas de plantas sin estrés salino se incrementó en 22.84 % y 28.61 % con CNT a 250 y 500 mg L<sup>-1</sup> en comparación con el control no sonificado. Bajo estrés salino el tratamiento CNT a 250 mg L<sup>-1</sup> indujo el mayor incremento de K en las hojas, 40.75 % más que el control no sonificado (Figura 5C). En los frutos de plantas sin estrés salino se observó una disminución de K con los tratamientos GP y CNT a 500 y 250 mg L<sup>-1</sup>, siendo 24.98 % y 27.79 % menos que el control sonificado. En los frutos de plantas con estrés salino no hubo diferencias entre tratamientos (Figura 5D).

El contenido de Ca solo fue afectado por los CNMs en los frutos de plantas sin estrés salino, donde se observó una disminución con los tratamientos GP y CNT a 500 y 250 mg L<sup>-1</sup> (34.45 % y 37.81 %, respectivamente, en comparación al control no sonificado) (Figura 5F). El contenido de Ca en las hojas no presentó diferencias entre tratamientos (Figura 5E).

El contenido de Mg en hojas de plantas sin estrés salino se incrementó en 52.87 % y 49.71 %, con los tratamientos GP y CNT a 50 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, en comparación al control sonificado. Bajo estrés salino, no se observaron diferencias entre tratamientos (Figura 5G). En los frutos de plantas sin estrés salino se observó que los tratamientos GP a 500 mg L<sup>-1</sup> y CNT a 250 y 500 mg L<sup>-1</sup>, disminuyeron el contenido de Mg en comparación al control no sonificado (27.48 %, 19.08 %, 21.37 %, respectivamente). En los frutos



**Figure 5. Macronutrient content in leaves and fruits of plants treated with CNMs and NaCl.** Different letters indicate significant difference between treatments according to LSD Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). ns: not significant;  $n = 6 \pm$  standard error.

**Figura 5. Contenido de macronutrientes en hojas y frutos de las plantas tratadas con con CNMs y NaCl.** Diferentes letras indican diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo a LSD Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). ns: no significativo;  $n = 6 \pm$  error estándar.

decreased the Mg content compared to the non-sonicated control (27.48 %, 19.08 %, 21.37 %, respectively). In the fruits of plants with saline stress, an increase in Mg of 22.35 % was observed with the GP treatment at 250 mg L<sup>-1</sup> compared to the non-sonicated control (Figure 5H).

The S content in the leaves of plants without saline stress decreased 22.12 % with the CNT treatment at 500 mg L<sup>-1</sup> compared to the sonicated control. In the leaves of plants with saline stress there were no differences between treatments (Figure 5I). In the fruits of plants without saline stress, it decreased 34.65 % with the CNT treatment at 250 mg L<sup>-1</sup> compared to the non-sonicated control. In the fruits of plants with saline stress there were no differences between treatments (Figure 5J).

The Na content in the leaves without salt stress was not modified by the CNMs treatments. However, in the leaves of plants with saline stress, Na increased 82.87 % with the GP treatment at 500 mg L<sup>-1</sup> compared to the non-sonicated control (Figure 5K). In the fruits of plants without stress there were no differences between treatments. And in fruits of plants with saline stress, the Na content increased 45.29 % with the GP treatment at 250 mg L<sup>-1</sup> compared to the non-sonicated control. However, the CNT treatment at 500 mg L<sup>-1</sup> decreased the Na content by 42.01 % compared to the sonicated control (Figure 5L).

The micronutrients in the leaves and fruits of tomato plants showed significant differences between treatments. The Fe concentration in the leaves of tomato plants was not modified by the treatments under any stress condition (Figure 6A). In the fruits of plants without saline stress, the Fe content increased significantly with the CNT treatment to 500 mg L<sup>-1</sup>, being 141.05 % more than the non-sonicated control. In the fruits of plants with saline stress, the GP treatment at 250 mg L<sup>-1</sup> increased the Fe content by 250.76 % compared to the non-sonicated control (Figure 6B).

The Cu content in the leaves of plants without saline stress was decreased by the GP treatment at 50 mg L<sup>-1</sup> compared to the non-sonicated control. In the leaves of plants with saline stress there were no differences in Cu content; however, it was observed that the concentration of this micronutrient was higher under saline stress (Figure 6C). In the fruits of plants without saline stress, the Cu content was increased with the application of CNT, being the treatment of 500 mg L<sup>-1</sup> the one that presented the greatest increase 108.13 % more than the non-sonicated control. In the fruits

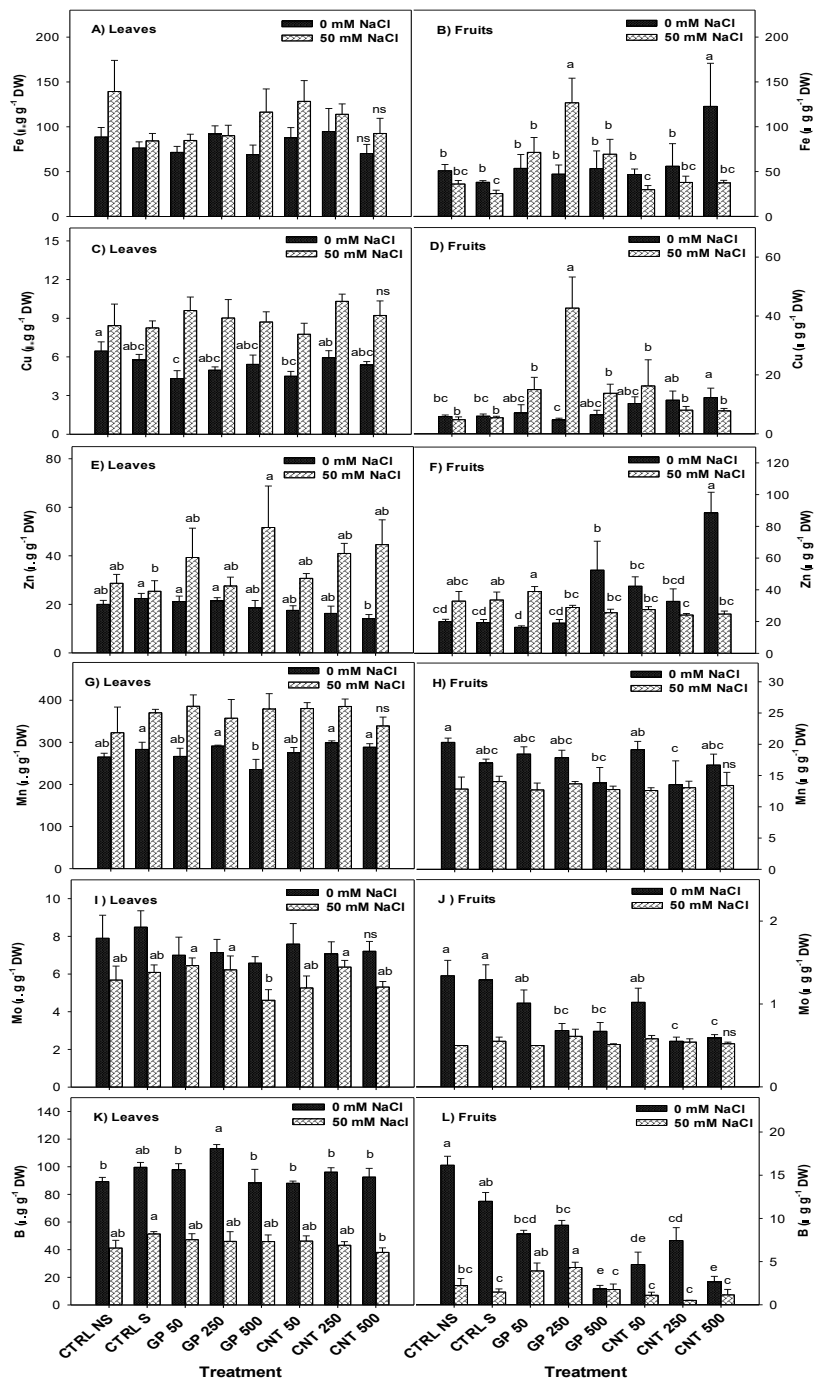
de plantas con estrés salino se observó un incremento de Mg de 22.35 % con el tratamiento GP a 250 mg L<sup>-1</sup> en comparación al control no sonicado (Figura 5H).

El contenido de S en las hojas de plantas sin estrés salino disminuyó 22.12 % con el tratamiento CNT a 500 mg L<sup>-1</sup> en comparación al control sonicado. En las hojas de plantas con estrés salino no hubo diferencias entre tratamientos (Figura 5I). En los frutos de plantas sin estrés salino disminuyó 34.65 % con el tratamiento CNT a 250 mg L<sup>-1</sup> en comparación al control no sonicado. En los frutos de plantas con estrés salino no hubo diferencias entre tratamientos (Figura 5J).

El contenido de Na en las hojas sin estrés salino no se modificó por los tratamientos de CNMs. Sin embargo, en las hojas de plantas con estrés salino el Na se incrementó 82.87 % con el tratamiento GP a 500 mg L<sup>-1</sup> en comparación al control no sonicado (Figura 5K). En los frutos de plantas sin estrés no hubo diferencias entre tratamientos. Y en frutos de plantas con estrés salino el contenido de Na se incrementó 45.29 % con el tratamiento GP a 250 mg L<sup>-1</sup> en comparación al control no sonicado. Sin embargo, el tratamiento de CNT a 500 mg L<sup>-1</sup> disminuyó 42.01 % el contenido de Na en comparación al control sonicado (Figura 5L).

Los micronutrientes en las hojas y frutos de las plantas de tomate presentaron diferencias significativas entre tratamientos. La concentración de Fe en las hojas de las plantas de tomate no se modificó por los tratamientos en ninguna condición de estrés (Figura 6A). En los frutos de plantas sin estrés salino el contenido de Fe se incrementó significativamente con el tratamiento CNT a 500 mg L<sup>-1</sup>, siendo 141.05 % más que el control no sonicado. En los frutos de plantas con estrés salino el tratamiento GP a 250 mg L<sup>-1</sup> incrementó 250.76 % el contenido de Fe en comparación al control no sonicado (Figura 6B).

El contenido de Cu en las hojas de plantas sin estrés salino fue disminuido por el tratamiento de GP a 50 mg L<sup>-1</sup> en comparación del control no sonicado. En las hojas de plantas con estrés salino no hubo diferencias en el contenido de Cu; sin embargo, se observó que la concentración de este micronutriente fue mayor bajo estrés salino (Figura 6C). En los frutos de plantas sin estrés salino se incrementó el contenido de Cu con la aplicación de CNT, siendo el tratamiento de 500 mg L<sup>-1</sup> el que presentó el mayor incremento 108.13% más que el control no sonicado. En los frutos de plantas con estrés salino el contenido de Cu



**Figure 6.** Micronutrient content in leaves and fruits of plants treated with CNMs and NaCl. Different letters indicate significant difference between treatments according to LSD Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). ns: not significant;  $n = 6 \pm$  standard error.

**Figura 6.** Contenido de micronutrientes en hojas y frutos de las plantas tratadas con con CNMs y NaCl. Diferentes letras indican diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo a LSD Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). ns: no significativo;  $n = 6 \pm$  error estándar.

of plants with saline stress, the Cu content increased with the GP treatment at 250 mg L<sup>-1</sup> in 789.16 % compared to the non-sonicated control (Figure 6D).

The Zn content in the leaves of plants without salt stress was not affected by the CNMs treatments. In the leaves of the plants with saline stress, the highest Zn content was observed with the GP treatment at 500 mg L<sup>-1</sup>, although it was only higher than the sonicated control in 103.54 % (Figure 6E). In the fruits of the plants without saline stress, the Zn content increased with the high doses of the two CNMs, the CNT treatment at 500 mg L<sup>-1</sup> presented an increase of 341.93 % and the GP at 500 mg L<sup>-1</sup> 161.75 %, compared to the non-sonicated control. Under saline stress, the CNT treatment at 250 mg L<sup>-1</sup> decreased the Zn concentration by 28.22 % compared to the sonicated control (Figure 6F).

The Mn content in plant leaves without saline stress was decreased with the GP treatment to 500 mg L<sup>-1</sup> compared to the sonicated control. In plant leaves with saline stress there were no differences between treatments; however, a higher Mn content was observed under salt stress (Figure 6G). In the fruits of plants without saline stress, a decrease in Mn content was presented with the GP treatments at 500 mg L<sup>-1</sup> and CNT at 250 mg L<sup>-1</sup> compared to the non-sonicated control (31.95 % and 33.33 %, respectively). In the fruits of plants with saline stress, no differences were observed between treatments (Figure 6H).

In the leaves of plants without saline stress, there were no differences between treatments in the content of Mo. Under the condition of saline stress, it was observed that the GP treatment at 500 mg L<sup>-1</sup> presented the lowest concentration of Mo, although it was not significantly different to the sonicated and non-sonicated controls (Figure 6I). In the fruits of plants without saline stress, the application of both CNMs at 250 and 500 mg L<sup>-1</sup> decreased the concentration of Mo compared to the non-sonicated control (GP 50-50.74 % and CNT 41.04-44.02 %). Under saline stress, there were no differences in the Mo content in the fruits (Figure 6J).

The B content in the leaves of plants without saline stress increased with GP to 250 mg L<sup>-1</sup>, 26.75 % more than the non-sonicated control. Under saline stress, only a 25.96 % decrease in B content was observed with CNT at 500 mg L<sup>-1</sup> compared to the sonicated control (Figure 6K).

se incrementó con el tratamiento GP a 250 mg L<sup>-1</sup> en 789.16 % en comparación al control no sonicado (Figura 6D).

El contenido de Zn en las hojas de plantas sin estrés salino no se afectó por los tratamientos de CNMs. En las hojas de las plantas con estrés salino se observó el mayor contenido de Zn con el tratamiento GP a 500 mg L<sup>-1</sup>, aunque solo fue mayor que el control sonicado en 103.54 % (Figura 6E). En los frutos de las plantas sin estrés salino se incrementó el contenido de Zn con las dosis altas de los dos CNMs, el tratamiento CNT a 500 mg L<sup>-1</sup> presentó un incremento de 341.93 % y el GP a 500 mg L<sup>-1</sup> 161.75 %, en comparación al control no sonicado. Bajo estrés salino el tratamiento CNT a 250 mg L<sup>-1</sup> disminuyó 28.22 % la concentración de Zn en comparación al control sonicado (Figura 6F).

El contenido de Mn en hojas de plantas sin estrés salino se disminuyó con el tratamiento GP a 500 mg L<sup>-1</sup> en comparación al control sonicado. En hojas de plantas con estrés salino no hubo diferencias entre tratamientos; sin embargo, se observó un mayor contenido de Mn bajo estrés salino (Figura 6G). En los frutos de plantas sin estrés salino se presentó una disminución en el contenido de Mn con los tratamientos de GP a 500 mg L<sup>-1</sup> y CNT a 250 mg L<sup>-1</sup> en comparación al control no sonicado (31.95 % y 33.33 %, respectivamente). En los frutos de plantas con estrés salino no se observaron diferencias entre tratamientos (Figura 6H).

En las hojas de plantas sin estrés salino no se presentaron diferencias entre tratamientos en el contenido de Mo. Bajo condición de estrés salino se observó que el tratamiento GP a 500 mg L<sup>-1</sup> presentó la concentración más baja de Mo, aunque no fue significativamente diferente a los controles sonicado y no sonicado (Figura 6I). En los frutos de plantas sin estrés salino la aplicación de ambos CNMs a 250 y 500 mg L<sup>-1</sup> disminuyó la concentración de Mo en comparación al control no sonicado (GP 50-50.74 % y CNT 41.04-44.02 %). Bajo estrés salino, no hubo diferencias en el contenido de Mo en los frutos (Figura 6J).

El contenido de B en las hojas de plantas sin estrés salino se incrementó con GP a 250 mg L<sup>-1</sup>, 26.75 % más que el control no sonicado. Bajo estrés salino, solamente se observó una disminución de 25.96 % en el contenido de B con CNT a 500 mg L<sup>-1</sup> en comparación al control sonicado (Figura 6K). En los frutos de plantas sin estrés salino se observó una disminución en la concentración de Boro (88.67 % con GP y 83.53 % con CNT) sobre todo con la dosis alta de

In the fruits of plants without saline stress, a decrease in Boron concentration (88.67 % with GP and 83.53 % with CNT) was observed, especially with the high dose of both CNMs (500 mg L<sup>-1</sup>), compared to the control no sonicated. Under saline stress, the GP treatment at 250 mg L<sup>-1</sup> induced an increase of 94.59 % compared to the non-sonicated control (Figure 6L).

## Discussion

Plants are a dynamic and flexible system capable of adapting to any change in its environment (Arsova *et al.*, 2019). Salinity stress induces morphological, physiological and biochemical changes in plants, and can cause ionic stress, osmotic stress and oxidative stress in plants (Machado-Guimarães *et al.*, 2020). In turn, ionic stress is caused by the accumulation of salt ions in the plant cells, which is why a nutrient deficiency is generated (Hernández, 2019; Wani *et al.*, 2020). In this regard, the ions that can induce salinity are sodium chloride (NaCl), sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>), calcium sulfate (CaSO<sub>4</sub>), magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>), potassium chloride (KCl) and sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), with NaCl being the most prevalent salt and with the greatest effect derived from its dissociation into Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> (Munns *et al.*, 2019).

Various studies report a positive role of CNMs applied in plants. Khodakovskaya *et al.* (2011) applied CNT (50, 100 and 200 mg L<sup>-1</sup>) in tomato seeds grown in Murashige and Skoog (MS) medium, and reported an increase in the biomass of the seedlings and the expression of the aquaporin gene (*LeAqp2*). Aquaporins promote a greater water absorption capacity within the seeds and therefore, a greater accumulation of biomass in the seedlings (Khodakovskaya *et al.*, 2009). Another gene favored by exposure to CNT in seeds is that of protein kinases, evaluated in tomato leaves, which are an important factor in the control of cell division and growth in plants (Khodakovskaya *et al.*, 2013). In the case of graphene, Nair *et al.* (2012) evaluated the effect of graphene (50 mg L<sup>-1</sup>) in rice seeds grown in MS medium enriched with the nanomaterial, and reported positive effects on rice seedlings, by improving germination and root growth and sprouts. While under saline stress conditions, CNMs have been shown to enhance the ability of plants to counteract the negative effects of stress. Martínez-Ballesta *et al.*

ambos CNMs (500 mg L<sup>-1</sup>), en comparación al control no sonicado. Bajo estrés salino, el tratamiento GP a 250 mg L<sup>-1</sup> indujo un incremento de 94.59 % en comparación al control no sonicado (Figura 6L).

## Discusión

Las plantas son un sistema dinámico y flexible capaz de adaptarse a cualquier cambio en su entorno (Arsova *et al.*, 2019). El estrés por salinidad induce cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en las plantas, y puede provocar estrés iónico, estrés osmótico y estrés oxidativo, en las plantas (Machado-Guimarães *et al.*, 2020). A su vez, el estrés iónico es causado por la acumulación de iones de sal en las células de la planta por lo que se genera una deficiencia de nutrientes (Hernández, 2019; Wani *et al.*, 2020). Al respecto, los iones que pueden inducir salinidad son cloruro de sodio (NaCl), sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>), sulfato de calcio (CaSO<sub>4</sub>), cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), cloruro de potasio (KCl) y carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), siendo el NaCl la sal más prevalente y de mayor efecto derivado de su disociación en Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (Munns *et al.*, 2019).

Diversos estudios reportan un papel positivo de los CNMs aplicados en plantas. Khodakovskaya *et al.* (2011), aplicaron CNT (50, 100 y 200 mg L<sup>-1</sup>) en semillas de tomate cultivadas en medio Murashige y Skoog (MS), y reportaron un incremento en la biomasa de las plántulas y la expresión del gen de las acuaporinas (*LeAqp2*). Las acuaporinas propician una mayor capacidad de absorción de agua dentro de las semillas y por ende, mayor acumulación de biomasa en las plántulas (Khodakovskaya *et al.*, 2009). Otro gen favorecido por la exposición a los CNT en semillas, es el de las proteínas quinasas, evaluadas en las hojas de tomate, los cuales son un factor importante en el control de la división y el crecimiento celular de las plantas (Khodakovskaya *et al.*, 2013). En el caso del grafeno, Nair *et al.* (2012) evaluaron el efecto del grafeno (50 mg L<sup>-1</sup>) en semillas de arroz cultivadas en medio MS enriquecido con el nanomaterial, y reportaron efectos positivos sobre las plántulas de arroz, al mejorar la germinación y el crecimiento de raíces y brotes. Mientras que, bajo condiciones de estrés salino se ha demostrado que los CNMs pueden mejorar la capacidad de las plantas para contrarrestar los efectos negativos ocasionados por el estrés. Martínez-Ballesta *et al.* (2016), demostraron que la aplicación de MWCNT (0-60 mg L<sup>-1</sup>) en la solución nutritiva Hoagland a plántulas de brócoli,



(2016), demonstrated that the application of MWCNT (0-60 mg L<sup>-1</sup>) in the Hoagland nutrient solution to broccoli seedlings, improved the germination and growth of broccoli (10 mg L<sup>-1</sup>) under saline stress (100 mM), since increased water absorption by roots and improved CO<sub>2</sub> assimilation. In addition, they reported greater accumulation in K and Na levels, followed by a high accumulation of MWCNT in plants under salinity stress. Vithanage *et al.* (2017), mention that CNMs can adsorb nitrogen from ammonia and release hydrogen ions, which improves the absorption of water and nutrients by plants. Therefore, an improvement in the absorption of nutrients such as N, P and K can be expected. However, CNMs can be transported by capillary action or transpiration, and as the transport pathway (xylem or phloem) is reduced, these can accumulate and block the passage of nutrients and other materials in the plant, in addition a high concentration of CNMs can cause agglomerations in these transport routes, which causes an imbalance in the absorption of nutrients and a reduction in the development and growth of the plants. This effect was demonstrated by Begum *et al.* (2011), who reported drastic decreases in root, stem and fresh biomass length with the highest doses of MWCNT (1000 and 2000 mg L<sup>-1</sup>) and graphene (500-2000 mg L<sup>-1</sup>) on seeds of red spinach, lettuce, rice, cucumber, chili and soy. Therefore, it is assumed that both the decrease in agronomic parameters, as well as the alteration in the nutrient content observed in this study, is due to an accumulation of CNMs with the highest dose in the organs of the treated plants in both stress conditions.

In general, NMs have the ability to enter the plant system, through the cell walls, via the apoplast, by endocytosis, through the absorption of the roots and translocate to the different organs of the plant (Chichiriccò & Poma, 2015; Khodakovskaya *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2019). However, in the case of seeds, the penetration of these CNMs is more difficult compared to other organs of the plants, due to their hard cover (Khodakovskaya *et al.*, 2009). However, it has been shown that sonicating the seeds improves the fluidity of the cell wall by breaking the rigid layer creating micropores or microcracks that facilitate the entry of both water and nutrients to the endosperm of the seed (Nazari & Eteghadipour, 2017; Rifna *et al.*, 2019). Ratnikova *et al.* (2015), evaluated seed sonication in conjunction with MWCNT (50 mg L<sup>-1</sup>) in tomato seeds and reported increases in seed germination, root growth and biomass. According to the results in this study, it is possible that by sonicating the CNMs together with the seeds, they have

mejoró la germinación y el crecimiento del brócoli (10 mg L<sup>-1</sup>) bajo estrés salino (100 mM), ya que aumentó la absorción de agua por las raíces y mejoró la asimilación de CO<sub>2</sub>. Además, reportaron mayor acumulación en los niveles de K y Na, seguido de una alta acumulación de MWCNT en plantas bajo estrés de salinidad. Vithanage *et al.* (2017) menciona que los CNMs pueden adsorber nitrógeno del amoníaco y liberar iones de hidrógeno, lo que mejora la absorción de agua y nutrientes por las plantas. Por lo tanto, se puede esperar una mejoría en la absorción de nutrientes como N, P y K. No obstante, los CNMs pueden transportarse por acción capilar o transpiración, y a medida que la vía de transporte (xilema o floema) se reduce, éstos pueden acumularse y bloquear el paso de nutrientes y otros materiales en la planta, además una alta concentración de CNMs puede causar aglomeraciones en estas vías de transporte, lo que ocasiona un desbalance en la absorción de nutrientes y una reducción en el desarrollo y crecimiento de las plantas. Este efecto fue demostrado por Begum *et al.* (2011), quienes reportaron disminuciones drásticas en la longitud de raíz, tallo y biomasa fresca con las dosis más altas de MWCNT (1000 y 2000 mg L<sup>-1</sup>) y grafeno (500-2000 mg L<sup>-1</sup>) sobre semillas de espinaca roja, lechuga, arroz, pepino, chile y soja. Por lo anterior, se asume que tanto la disminución de los parámetros agronómicos, al igual que la alteración en el contenido de nutrientes observado en este estudio, se debe a una acumulación de CNMs con la dosis mas alta en los órganos de las plantas, tratadas en ambas condiciones de estrés.

En general los NMs tienen la capacidad de ingresar al sistema de la planta, a través de las paredes celulares, por la vía del apoplasto, por endocitosis, a través de la absorción de las raíces y translocarse a los diferentes órganos de la planta (Chichiriccò & Poma, 2015; Khodakovskaya *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2019). Sin embargo, en el caso de las semillas la penetración de estos CNMs es más difícil en comparación con otros órganos de las plantas, debido a la cubierta dura de la misma (Khodakovskaya *et al.*, 2009). No obstante, se ha demostrado que al sonicar las semillas se mejora la fluidez de la pared celular al romper la capa rígida creando microporos o microgrietas que facilitan el ingreso tanto de agua como de nutrientes al endospermo de la semilla (Nazari & Eteghadipour, 2017; Rifna *et al.*, 2019). Ratnikova *et al.* (2015), evaluaron la sonicación de semillas en conjunto con MWCNT (50 mg L<sup>-1</sup>) en semillas de tomate y reportaron aumentos en la germinación de semillas, el crecimiento de raíces y biomasa. De acuerdo a los resultados en este estudio, es posible que al sonicar

penetrated the seed more easily, which caused morphological changes in the plants, since the CNMs can act as a stress factor (Khodakovskaya *et al.*, 2011). In addition, they were able to activate a cascade of signals to improve the defense system of plants and counteract the negative effects of possible biotic or abiotic stresses (Zhao *et al.*, 2020).

In summary, there are different physiological responses in plants exposed to CNMs, this could be due to the different properties of CNMs, such as shape, size, surface load, as well as exposure time, route of application and cultivation in study (Vithanage *et al.*, 2017; Zaytseva & Neumann, 2016).

In addition, the tubular structure of CNTs compared to graphene sheets can positively or negatively affect their interaction with the biological system (Zaytseva & Neumann, 2016; Zhang *et al.*, 2015).

## Conclusions

The application of the CNMs showed different results depending on the variables evaluated as well as the stress conditions of the crop. Without saline stress, stem diameter and dry biomass increased with CNMs, while fresh biomass decreased with CNT (500 mg L<sup>-1</sup>).

Furthermore, the addition of CNMs induced both positive and negative effects on the absorption of nutrients by plants. In leaves without salt stress, the content of K, Mg and B increased, while S, Cu and Mn decreased. Under saline stress, the content of P, Mo and B decreased; but the content of K, Na and Zn was increased. In the fruits without salt stress, the content of P, K, Ca, Mg, S, Mn, Mo and B was reduced, however the content of Fe, Cu and Zn was increased. Under saline stress, the content of Mg, Na, Fe, Cu and B increased, while Zn decreased its content.

Na was increased considerably in the organs of the tomato plant when exposed to salinity, which reflects a reduction in its growth and development. However, it was observed that this effect can be counteracted by adding the CNMs, by improving the height of the plant, as well as the fresh and dry biomass. Therefore, it is of great importance to know the biochemical, metabolic or other responses that CNMs induce in plants to understand how tolerance to salt stress occurs.

los CNMs junto con las semillas, éstos hayan penetrado a la semilla con mayor facilidad, lo que ocasiono cambios morfológicos en las plantas, debido a que los CNMs pueden actuar como un factor de estrés (Khodakovskaya *et al.*, 2011), activando una cascada de señales para mejorar el sistema de defensa de las plantas y contrarrestar los efectos negativos de posibles estreses bióticos o abióticos (Zhao *et al.*, 2020).

En resumen, existen diferentes respuestas fisiológicas en las plantas expuestas a los CNMs, esto podría deberse a las distintas propiedades de los CNMs, como la forma, tamaño, carga superficial, así como el tiempo de exposición, la vía de aplicación y el cultivo en estudio (Vithanage *et al.*, 2017; Zaytseva & Neumann, 2016).

## Conclusiones

La aplicación de los CNMs muestran resultados diferentes dependiendo de las variables evaluadas, así como de las condiciones de estrés del cultivo. Sin estrés salino, el diámetro de tallo y la biomasa seca se incrementaron con los CNMs, mientras que la biomasa fresca disminuyó con CNT (500 mg L<sup>-1</sup>).

Además, la adición de los CNMs induce efectos tanto positivos como negativos en la absorción de los nutrientes por las plantas. En hojas sin estrés salino, se incrementó el contenido de K, Mg y B, mientras que el S, Cu y Mn disminuyeron. Bajo estrés salino disminuyó el contenido de P, Mo y B; pero se incrementó el contenido de K, Na y Zn. En los frutos sin estrés salino, se redujo el contenido de P, K, Ca, Mg, S, Mn, Mo y B, no obstante, se incrementó el contenido de Fe, Cu y Zn. Bajo estrés salino aumentó el contenido de Mg, Na, Fe, Cu y B, mientras que el Zn disminuyó su contenido.

El Na fue incrementado considerablemente en los órganos de la planta de tomate al estar expuestas a la salinidad, lo que se refleja una reducción del crecimiento y desarrollo de la misma. Sin embargo, se observó que este efecto puede ser contrarrestado al adicionar los CNMs, al mejorar la altura de la planta, así como la biomasa fresca y seca. Por lo tanto, es de gran importancia conocer las respuestas bioquímicas, metabólicas u otras, que inducen los CNMs en las plantas para entender cómo se da la tolerancia al estrés salino.

## References

- Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A. and Hayat, S. (2020). Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology Biochemistry*, 156, 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.042>
- Arsova, B., Foster, K. J., Shelden, M. C., Bramley, H. and Watt, M. (2019). Dynamics in plant roots and shoots minimize stress, save energy and maintain water and nutrient uptake. *New Phytologist*, 225: (3), 1111–1119. <https://doi.org/10.1111/nph.15955>
- Begum, P., Ikhtiar, R. and Fugetsu, B. (2011). Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach and lettuce. *Carbon*, 49:(12), 3907–3919. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.05.029>
- Chichiriccò, G. & Poma, A. (2015). Penetration and toxicity of nanomaterials in higher plants. *Nanomaterials*, 5:(2), 851–873. <https://doi.org/10.3390/nano5020851>
- Devkar, V., Thirumalaikumar, V. P., Xue, G.-P., Vallarino, J. G., Turečková, V., Strnad, M., Fernie, A. R., Hoefgen, R., Mueller Roeber, B. and Balazadeh, S. (2019). Multifaceted regulatory function of tomato SITAF1 in the response to salinity stress. *New Phytologist*, 225:(4), 1681–1698. <https://doi.org/10.1111/nph.16247>
- Farooq, M., Gogoi, N., Hussain, M., Barthakur, S., Paul, S., Bharadwaj, N., Migdadi, H. M., Alghamdi, S. S. and Siddique, K. H. M. (2017). Effects, tolerance mechanisms and management of salt stress in grain legumes. *Plant Physiology Biochemistry*, 118, 199–217. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.020>
- Gao, M., Xu, Y., Chang, X., Dong, Y. and Song, Z. (2020). Effects of foliar application of graphene oxide on cadmium uptake by lettuce. *Journal of Hazardous Materials*, 398: (5), 122859. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122859>
- Gilbertson, L. M., Pourzahedi, L., Laughton, S., Gao, X., Zimmerman, J. B., Theis, T. L., Westerhoff, P. and Lowry, G. V. (2020). Guiding the design space for nanotechnology to advance sustainable crop production. *Nature Nanotechnology*, 15, 801–810. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0706-5>
- Hernández-Hernández, H., González-Morales, S., Benavides-Mendoza, A., Ortega-Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G. and Juárez-Maldonado, A. (2018). Effects of chitosan-PVA and Cu nanoparticles on the growth and antioxidant capacity of tomato under saline stress. *Molecules*, 23:(1), 178 <https://doi.org/10.3390/molecules23010178>
- Hernández, J. A. (2019). Salinity tolerance in plants: Trends and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 20:(10), 2408. <https://doi.org/doi:10.3390/ijms20102408>
- Husen, A. & Siddiqi, K. S. (2014). Carbon and fullerene nanomaterials in plant system. *Journal of Nanobiotechnology*, 12:(16), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-16>
- Joshi, A., Kaur, S., Dharamvir, K., Nayyar, H. and 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.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98:(8), 3148–3160. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8818>
- Joshi, A., Sharma, L., Kaur, S., Dharamvir, K., Nayyar, H. and Verma, G. (2020). Plant nanobionic effect of multiwalled carbon nanotubes on growth, anatomy, yield and grain composition of rice. *Bionanoscience*, 10, 430–445. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00725-1>
- Kamran, M., Parveen, A., Ahmar, S., Malik, Z., Hussain, S., Chattha, M. S., Saleem, M. H., Adil, M., Heidari, P. and Chen, J.T. (2020). An overview of hazardous impacts of soil salinity in crops, tolerance mechanisms, and amelioration through selenium supplementation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21:(1), 148. <https://doi.org/10.3390/ijms21010148>
- Kashyap, S. P., Kumari, N., Mishra, P., Prasad Moharana, D., Aamir, M., Singh, B. and Prasanna, H.C. (2020). Transcriptional regulation mediating ROS homeostasis and physio-biochemical changes in wild tomato (*Solanum chilense* L.) and cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under high salinity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27:(8), 1999–2009. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.06.032>
- Kayess, O., Rahman, L., Ahmed, K., Khan, R., Hossain, S., Hossain, M. S., Khanam, M. M. and Pal, D. C. (2020). Effect of salinity stress on different root and shoot traits of selected tomato cultivars. *Asian Journal of Advanced Research and Reports*, 8:(1), 1–9. <https://doi.org/10.9734/AJARR/2020/v8i130188>
- Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F. and 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. <https://doi.org/10.1021/nn900887m>
- Khodakovskaya, M. V., Bong-Soo, K., Kim, J. N., Alimohammadi, M., Dervishi, E., Mustafa, T. and 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>
- Khodakovskaya, M. V., De Silva, K., Nedosekin, D. A., Dervishi, E., Biris, A. S., Shashkov, E. V., Galanzha, E. I. and Zharov, V. P. (2011). Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *PNAS*, 108:(3), 1028–1033. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008856108>
- Kosová, K., Prášil, I. T. and Vítámvás, P. (2013). Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition. *International Journal of Molecular Sciences*, 14:(4), 6757–6789. <https://doi.org/10.3390/ijms14046757>
- López-Vargas, E. R., González-García, Y., Pérez-Álvarez, M., Cadenas-Pliego, G., González-Morales, S., Benavides-Mendoza, A., Cabrera, R. I. and Juárez-Maldonado, A. (2020). Seed priming with carbon nanomaterials to modify the germination, growth, and antioxidant status of tomato seedlings. *Agronomy*, 10: (5), 639. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050639>
- Ma, X. & Yan, J. (2018). Plant uptake and accumulation of engineered metallic nanoparticles from lab to field conditions. *Current Opinion Environmental Science & Health*, 6, 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.07.008>
- Machado-Guimarães, M. J., Lima-Simões, W., Alves-Barros, J. R. and Gomes-Willadino, L. (2020). Salinity decreases transpiration of sorghum plants. *Experimental Results*, 1, e14 <https://doi.org/10.1017/exp.2020.22>
- Martínez-Ballesta, M. C., Zapata, L., Chalbi, N. and Carvajal, M. (2016). Multiwalled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. *Journal of Nanobiotechnology*, 14, 42 <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0199-4>
- Mukherjee, A., Majumdar, S., Servin, A. D., Pagano, L., Dhankher, O. P. and White, J. C. (2016). Carbon nanomaterials in agriculture: A critical review. *Frontiers in Plant Science*, 7, 172. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00172>
- Munns, R., Passioura, J.B., Byrt, C.S. and Colmer, T.D. (2019). Osmotic adjustment and energy limitations to plant growth in saline soil. *New Phytologist*, 225:(3), 1091-1096. <https://doi.org/10.1111/nph.15862>
- Nair, R., Mohamed, M. S., Gao, W., Maekawa, T., Yoshida, Y., Ajayan, P. M. and Kumar, D.S. (2012). Effect of carbon nanomaterials on the germination and growth of rice plants. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12:(3), 2212–2220. <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.5775>
- Nazari, M. & Eteghadipour, M. (2017). Impacts of ultrasonic waves on seeds: A mini review. *Agricultural Reserach Technology*, 6:(3), 555688. <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.06.555688>
- Phogat, V., Mallants, D., Cox, J. W., Šimunek, J., Oliver, D. P. and Awad, J. (2020). Management of soil salinity associated with irrigation of protected crops. *Agricultural Water Management*, 227, 105845. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.105845>
- Ratnikova, T. A., Podila, R., Rao, A. M. and Taylor, A.G. (2015). Tomato seed coat permeability to selected carbon nanomaterials and enhancement of germination and seedling growth. *The Scientific World Journal*, 2015, 419215. <https://doi.org/10.1155/2015/419215>
- Rifna, E. J., Ramanan, K. R. and Mahendran, R. (2019). Emerging technology applications for improving seed germination. *Trends in Food Science Technology*, 86, 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.029>
- Samadi, S., Asgari Lajayer, B., Moghiseh, E. and Rodriguez-Couto, S. (2021). Effect of carbon nanomaterials on cell toxicity, biomass production, nutritional and active compound accumulation in plants. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 101323. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101323>
- Sanzari, I., Leone, A. and Ambrosone, A. (2019). Nanotechnology in plant science: To make a long story short. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7:120, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00120>
- Sayedena, S. V., Pilehvar, B., Abrari-Vajari, K., Zarafshar, M. and Eisvand, H.R. (2018). Effects of seed nano-priming with multiwall carbon nanotubes (MWCNT) on seed germination and seedlings growth parameters of mountain ash (*Sorbus luristanica* Bornm.). *Iran Journal of Forest and Poplar Research*, 26:(2), 202–214. <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?ID=651473>
- Sewelam, N., Kazan, K. and Schenk, P. M. (2016). Global plant stress signaling: Reactive oxygen species at the cross-road. *Frontiers in Plant Science*, 7, 187. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00187>
- Singh, H., Kumar, P., Kumar, A., Kyriacou, M. C., Colla, G. and Roupshael, Y. (2020). Grafting tomato as a tool to improve salt

- tolerance. *Agronomy*, 10: (2), 263 <https://doi.org/doi:10.3390/agronomy10020263>
- Steiner, A. A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil*, 15, 134–154. <https://doi.org/10.1007/BF01347224>
- Singh, H., Kumar, P., Kumar, A., Kyriacou, M. C., Colla, G. and Roupshael, Y. (2020). Grafting tomato as a tool to improve salt tolerance. *Agronomy*, 10: (2), 263 <https://doi.org/doi:10.3390/agronomy10020263>
- Verma, S. K., Das, A. K., Gantait, S., Kumar, V. and 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>
- Vithanage, M., Seneviratne, M., Ahmad, M., Sarkar, B. and Ok, Y. S. (2017). Contrasting effects of engineered carbon nanotubes on plants: a review. *Environmental Geochemistry and Health*, 39, 1421–1439. <https://doi.org/10.1007/s10653-017-9957-y>
- Wang, Q., Li, C., Wang, Y. and Que, X. (2019). Phytotoxicity of graphene family nanomaterials and its mechanisms: A Review. *Frontiers in Chemistry*, 7:(292), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00292>
- Wani, S. H., Kumar V., Khare, T., Guddimalli, R. Parveda, M., Solymosi, K., Suprasanna, P. and Kishor, P. B. K. (2020). Engineering salinity tolerance in plants: Progress and prospects. *Planta*, 251, 1–29. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03366-6>
- Zaytseva, O. & Neumann, G. (2016). Carbon nanomaterials: Production, impact on plant development, agricultural and environmental applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3,17. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0070-8>
- Zhang, M., Gao, B., Chen, J. and Li, Y. (2015). Effects of graphene on seed germination and seedling growth. *Journal of Nanoparticle Research*, 17, 78. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-2885-9>
- Zhao, L., Lu, L., Wang, A., Zhang, H., Huang, M., Wu, H., Xing, B., Wang, Z. and Ji, R. (2020). Nano-biotechnology in agriculture: Use of nanomaterials to promote plant growth and stress tolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68:(7), 1935–1947. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06615>
- Zörb, C., Geilfus, C.M. and Dietz, K.-J. (2019). Salinity and crop yield. *Plant Biology*, 21:(S1), 31–38. <https://doi.org/10.1111/plb.12884>