



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Agropecuarias

School of Forestry and Environmental Studies

Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales

Department of Agricultural Sciences and Forestry

Tulancingo de Bravo, Hidalgo., a 18 de enero de 2024

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar de la UAEH

Por este conducto y con fundamento en el Título Cuarto, Capítulo I, Artículo 40 del Reglamento de Titulación, le comunico que el jurado que le fue asignado a la pasante de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía para la Producción Sustentable, **Iris López Gómez**, quien presenta el trabajo de Tesis denominado "**Aplicación de nanopartículas de plata (AgNPs) para la inhibición del hongo fitopatógeno causante de la negrilla en Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck**", que después de revisarlo en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión de este, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los miembros del jurado:

PRESIDENTE Dr. Jaime Pacheco Trejo
SECRETARIO Dr. Víctor Hugo Pérez España
VOCAL 1 Dra. Mariana Saucedo García
SUPLENTE 1 Dr. José Alfredo Pescador Rojas




Sin otro particular por el momento, me despido de usted.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"


Dr. Benito Flores Chávez
Coordinador Ingeniería en Agronomía
para la Producción Sustentable

Avenida Universidad Km. 1 s/n,
Exhacienda Aquetzalpa Tulancingo
de Bravo, Hidalgo, México; C.P. 43600
Teléfono: 771 71 72000 ext 2461
alfredo_madariaga@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx

Agradecimientos

A mis profesores

Al Mtro. Víctor Cardozo Mata por compartir sus conocimientos, capacitación y tiempo que fueron bases para el desarrollo de esta tesis.

A mis directores de tesis, la Dra. Mariana Saucedo García y el Dr. José Alfredo Pescador Rojas por el apoyo, asesoría, información académica y tiempo brindado.

Al Dr. Eduardo Rangel Cortés, el Dr. Víctor Hugo Pérez España y a la Dra. Teresa Romero Cortés, pertenecientes a la Escuela Superior de Apan, por su apoyo, asesoría, información académica brindada y donación de las cepas utilizadas en el proyecto de tesis.

Al Dr. Sergio Rubén Pérez Ríos y al Dr. Jaime Pacheco Trejo, pertenecientes al Instituto de Ciencias Agropecuarias, por su apoyo en insumos, asesoría e información académica brindada.

A SENASICA

Al Laboratorio de Micología de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) perteneciente al Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) que en colaboración nos brindaron espacio, capacitación, soporte técnico y asesoría para la identificación y caracterización del hongo, en especial a Nayeli Carrillo Ortiz a cargo de la identificación morfométrica, Adrián Gonzáles Saucedo a cargo de la identificación molecular y a Lervin Hernández Ramos a cargo del análisis filogenético.

A LA ESAp

A la Escuela Superior de Apan que en colaboración me brindaron un espacio en donde adquirí conocimientos y capacitación.

A los laboratorios

Al Laboratorio de Química y Microbiología a cargo de la Mtra. Wendy Montserrath Delgadillo Ávila de la Escuela Superior de Apan, por el espacio, préstamo de materiales y soporte técnico brindado.

Al Laboratorio de Fitopatología y Plagas a cargo de la Dra. Mariana Saucedo García, del Instituto de Ciencias Agropecuarias por el espacio, préstamo de materiales y soporte técnico brindado.

Dedicatoria

Principalmente quiero agradecer y dedicar este trabajo a DIOS, a mi mamá Alma Delia López Gómez, la mujer que me enseñó a persistir, resistir y nunca desistir, quién a pesar de todas las dificultades que se nos presentaron jamás dejó de intentar, continuo luchando por ambas para que pudiese tener un mejor futuro, quién me hizo comprender que la curiosidad puede llevarte a un lugar sin fin, que los límites solo son los que tú mismo te impones y que los problemas son oportunidades para mejorar y ampliar los horizontes. Mil gracias por todo.

Este proyecto de tesis me llevo a entender cuan atados por nuestros propios juicios estamos en espera de las respuestas a problemáticas que nosotros mismos podríamos solucionar. No solo los agricultores, mis compañeros y colegas de distintas áreas no incurrimos en el mundo de la ciencia con la excusa de falta de conocimientos. Aunque si bien, las razones que dieron origen a este proyecto fueron personales, también fue realizado para aportar a los agricultores e inspirar a aquellos quienes lean este trabajo, a no limitarse, los límites son los que uno mismo construye y a su vez, estos pueden reconstruirse para crear algo nuevo.

No les voy a mentir, se requiere de tiempo, esfuerzo y compromiso, pero no es tan difícil, no solo enfrenté obstáculos para adquirir conocimientos que no forman parte de mi curriculum, no siempre fui aceptada debido a mi formación agrícola y no científica, pero sin importar ello, logré concluirlo y adquirí conocimientos si bien, no igualitarios, suficientes para lograr mi objetivo.

La ciencia está al alcance de todos, solo se requiere un poco de voluntad y curiosidad.

Está dedicado a mi alma mater, la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, al Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp) lugar donde realicé mis estudios universitarios, a la Escuela Superior de Apan, en donde conocí amigos y personas que me ayudaron para el desarrollo de este proyecto, mi más sincero agradecimiento, en especial a mi amigo Luis Omar, quién fue parte fundamental, ya que no solo me inspiró, sino también, me motivo a iniciar con este gran proyecto de investigación.

Este trabajo dejó de ser solo mío desde hace tiempo, para ser de todos aquellos que contribuimos para llevarlo a cabo, así que es de y para todos nosotros. Cabe destacar la participación del Lic. Marco Antonio Navarrete Ayala, a quien agradezco por el espacio brindado para el desarrollo experimental, a la Dra. Adriana Cortázar y al Dr. Tomás Gómez por el apoyo brindado tanto de hospedaje como transporte, a mis amigos Eduardo Gustavo, Angélica Andrea, Carlos, Sebastián Samperio, Heber, entre otros, gracias por la ayuda tanto en las partes experimentales como teóricas, el tiempo brindado y sobre todo por su amistad.

En especial está dedicado a mi familia.

Por ultimo está dedicado en memoria de mi abuelito Adolfo López Acosta y Ernesto Rafael Vega Guerrero.

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AgNPs: Nanopartículas de plata.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATP: Adenosín trifosfato.

BLAST: Basic local alignment search tool – NCBI (Herramienta básica de búsqueda de alineación local – NCBI).

CAM: Crassulacean acid metabolism (Metabolismo ácido de las crasuláceas).

EDS: Energy dispersive X-ray spectroscopy (Espectroscopia de rayos X dispersados).

MIPE: Manejo integrado de plagas y enfermedades.

NPK: Nitrógeno (N), Fosforo (P) y Potasio (K).

NPs: Nanopartículas.

PCR: Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).

PEP: Phosphoenolpyruvate (Fosfoenolpiruvato).

PEPC: Phosphoenolpyruvate carboxylase (Fosfoenolpiruvato carboxilasa).

PMF: Proton motive force dissipation (Disipación de la fuerza motriz de protones).

PVP: Polyvinylpyrrolidone polymer (Polímero Polivinilpirrolidona).

REL: Recommended exposure limit (Límite de exposición recomendado).

ROS: Reactive oxygen species (Especies reactivas de oxígeno).

RuBisCO: Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa.

SEM: Scanning Electronic Microscopy (Microscopia Electrónica de Barrido).

TEM: Transmission electron microscopy (Microscopia Electrónica de Transmisión).

UV-vis: Ultravioleta-visible.

Contenido

Resumen.....	1
1. Introducción	2
1.1. Descripción taxonómica del agave.....	2
1.2. Morfología general del agave.....	2
1.3. Fisiología general del agave	3
1.4. Reproducción del agave	4
1.4.1. Reproducción sexual	4
1.4.2. Reproducción asexual	4
1.5. <i>Agave salmiana</i>	4
1.5.1. Variedades de <i>A. salmiana</i>	5
1.5.2. Servicios ambientales que ofrece el cultivo de <i>A. salmiana</i>	7
1.5.3. Explotación comercial de la planta y derivados de <i>A. salmiana</i>	7
1.5.4. Manejo agronómico de plantaciones de <i>A. salmiana</i>	13
1.5.5. Problemas fitosanitarios <i>A. salmiana</i>	15
1.6. Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades	17
1.6.1. Propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata.....	18
1.6.2. Métodos de síntesis de nanopartículas en disolución	20
1.6.3. Métodos de caracterización de las nanopartículas.....	21
1.6.4. Efecto toxicológico de la plata	24
2. Antecedentes	26
3. Planteamiento del problema	28
4. Justificación.....	29
5. Objetivos	30
5.1. Objetivo General	30
5.2. Objetivos Específicos.....	30
6. Hipótesis.....	31
7. Materiales y métodos	32
7.1. Descripción del área de estudio.....	32
7.2. Obtención del material biológico vegetal.....	32
7.2.1. Selección y manejo de hijuelos de <i>A. salmiana</i> a partir de características fenológicas ..	32
7.3. Obtención y caracterización del material microbiológico.....	32
7.3.1. Aislamiento del agente patogénico extraído de lesiones foliares en <i>A. salmiana</i>	32

7.3.2.	Crecimiento y conservación del hongo	32
7.3.3.	Identificación y caracterización del agente causal de negrilla en <i>A. salmiana</i>	32
7.4.	Síntesis de nanopartículas de plata	36
7.4.1.	Caracterización morfológica y estructural de las nanopartículas de plata (AgNPs) .	37
7.5.	Evaluación del efecto de las nanopartículas de plata (AgNPs) en el crecimiento <i>in vitro</i> del hongo.....	37
7.6.	Evaluación del efecto de AgNPs en el crecimiento <i>in vivo</i> del agente causal de la negrilla inoculado en hojas de <i>A. salmiana</i>	38
7.6.1.	Obtención de suspensión de conidios.....	38
7.6.2.	Cuantificación de conidios	38
7.6.3.	Preparación del inóculo.....	38
7.6.4.	Inoculación por aspersión del agente causal de negrilla en tejido vegetal de <i>A. salmiana</i> .	38
	Evaluación de sintomatología	41
7.7.	Análisis estadísticos	42
8.	Resultados	43
8.1.	Evaluación de condiciones óptimas de crecimiento <i>in vitro</i> del agente causal de la negrilla	43
8.2.	Identificación y caracterización del agente causal de negrilla en <i>A. salmiana</i>	45
8.2.1.	Identificación morfométrica.....	45
8.2.2.	Análisis filogenético de secuencias genómicas de ADN	46
8.3.	Caracterización morfológica, estructural y molecular de las nanopartículas de plata (AgNPs).....	48
8.4.	Evaluación del efecto de las nanopartículas de plata en el crecimiento <i>in vitro</i> del hongo	53
8.5.	Evaluación <i>in vivo</i> del efecto toxicológico de las nanopartículas de plata (AgNPs) sobre el fenotipo de los hijuelos de <i>A. salmiana</i>	54
8.5.1.	Evaluación de incidencia.....	54
8.5.2.	Evaluación de severidad.....	55
9.	Discusión de Resultados.....	57
10.	Conclusiones	60
11.	Referencias	61

Lista de Figuras

Figura 1. Morfología del agave.	3
Figura 2. Raspador, herramienta para realizar el capado, Epazoyucan, Hidalgo.	11
Figura 3. Extracción y fermentación de agua miel.	12
Figura 4. Mecanismos obtenidos por la síntesis de AgNPs con citrato de sodio.	21
Figura 5. Representación esquemática del sistema de Espectroscopia UV-vis.	22
Figura 6. Espectroscopía de rayos X de Energía Dispersiva (EDS).	22
Figura 7. Representación esquemática de la Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).	23
Figura 8. Efecto de las nanopartículas de plata (AgNPs) a diferente concentración asperjadas pre y post inoculación del agente patogénico a diferentes grupos constituidos por ocho hijuelos de <i>A. salmiana</i>	40
Figura 9. Categorías de severidad.	42
Figura 10. Efecto del pH 4 del medio de cultivo en el crecimiento de tres diferentes cepas del agente patogénico responsable de la negrilla.	43
Figura 11. Efecto del pH 5 del medio de cultivo en el crecimiento de tres diferentes cepas del agente patogénico responsable de la negrilla.	44
Figura 12. Crecimiento del patógeno causante de negrilla a los 30 días en medio PDA.	45
Figura 13. Identificación morfométrica del hongo causante de la negrilla.	46
Figura 14. Árbol filogenético basado en secuencias de la región ITS del ADN de hongos. La flecha señala al hongo obtenido del estudio. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap.	47
Figura 15. Curvas de absorbancia a diferentes concentraciones de AgNPs obtenidas por Espectroscopía Uv-vis.	48
Figura 16. Micrografías representativas resultados de la caracterización de AgNPs a diferentes concentraciones con SEM.	49
Figura 17. Caracterización e identificación de composición de las AgNPs a 80 ppm obtenidas por SEM.	50
Figura 18. Caracterización e identificación de composición de las AgNPs a 100 ppm obtenidas por SEM.	51
Figura 19. Caracterización e identificación de composición de las AgNPs a 150 ppm obtenidas por SEM.	52
Figura 20. Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento del agente fitopatógeno a diferentes concentraciones de AgNPs en medio PDA.	53
Figura 21. Evaluación de efecto toxicológico en fenotipos de <i>A. salmiana</i> asperjados con diferentes concentraciones de AgNPs.	54

Lista de Tablas

Tabla 1. Categoría taxonómica del agave	2
Tabla 2. Variedades de <i>Agave salmiana</i>	6
Tabla 3. Plagas asociadas al agave.....	16
Tabla 4. Enfermedades asociadas al agave	17
Tabla 5. Componentes para la preparación de mezcla PCR master mix con base en el kit Platinum™ Taq ADN Polymerase de Invitrogen	34
Tabla 6. Oligonucleótidos	35
Tabla 7. Categorías de severidad para la evaluación de daños producidos por el agente causal de negrilla en <i>Agave salmiana</i>	41
Tabla 8. Evaluación del porcentaje de incidencia en fenotipos de <i>A. salmiana</i> asperjados con AgNPs a diferente concentración a los 70 días pre y post inoculación.	55
Tabla 9. Evaluación del porcentaje de severidad en fenotipos de <i>A. salmiana</i> asperjados con AgNPs a diferente concentración a los 70 días pre y post inoculación.	56

Resumen

Los magueyes o agaves, son plantas endémicas de gran importancia en México; país considerado como centro de origen y diversificación del género. En el Estado de Hidalgo, el agave es ampliamente aprovechado debido a sus múltiples servicios agroecológicos y por sus derivados. Actualmente, el maguey se ve afectado por la negrilla o viruela, una enfermedad que se presenta en las hojas y se caracteriza por la aparición de manchas foliares de color negro.

Con la finalidad de identificar el agente patogénico causante de dicha enfermedad, se aislaron hongos de las zonas infectadas por la negrilla en hojas de *A. salmiana*. Las cepas puras fueron evaluadas a nivel micro y macroscópico; se identificó al hongo fitopatógeno del género *Bipolaris* como posible agente causal de dicha enfermedad. El estudio también incluyó la identificación a nivel molecular del hongo, se secuenció el gen ribosomal 18S y se obtuvo un 99.78% de identidad con *Bipolaris zeae*.

En el presente trabajo se evaluó la actividad antifúngica de las nanopartículas de plata, con un posible efecto inhibitorio contra el agente fitopatogeno causante de la enfermedad “negrilla”. Inicialmente, se realizaron experimentos *in vitro* en los cuales se adiciono nanopartículas de plata en un medio acuoso, a concentraciones de 0, 10, 30 y 45 ppm, posteriormente se inoculo el medio de crecimiento con el hongo aislado. Los resultados demostraron una alta susceptibilidad del hongo hacia las nanopartículas. El efecto inhibitorio también fue corroborado en experimentos *in vivo*, los cuales incluyeron tratamientos preventivos o correctivos. En ambos tratamientos se observó un efecto dosis-respuesta, en el que a mayor concentración se presentaron los menores índices de incidencia y severidad.

1. Introducción

Los magueyes o agaves, pertenecen a la familia de las Asparagaceae, son plantas perennes, herbáceas o arbustivas; con bulbo o rizoma; sus hojas gruesas, carnosas, fibrosas y con bordes espinosos dispuestas en forma de rosetas. Presentan flores hermafroditas, la inflorescencia en racimo (umbelas) son espigas o panículas con brácteas grandes en la base, el tubo del perianto es corto con seis estambres en la base de los segmentos o sobre el tubo (García-Mendoza, 2007).

1.1. Descripción taxonómica del agave

El género agave, identificado por Carlos Linneo en 1753, pertenece a la familia Asparagaceae y subfamilia Agavoideae (Tabla 1; APG III, 2009; APG IV, 2016; TROPICOS, 2022; NYBG, 2022); y se divide en dos subgéneros: *Littaea* y *Agave* (Gentry, 1982). El continente americano alberga aproximadamente 273 especies, de las cuales el 75% se encuentran distribuidas en México. Se estima que el 55% de las especies de agaves son endémicas de México (Granados, 1993; Illsey *et al.*, 2005), siendo considerado como centro de origen y diversificación de este género (Nobel, 1988; García-Mendoza, 2007; García-Herrera *et al.*, 2010).

Tabla 1. Categoría taxonómica del agave

Reino	Plantae
División	Mangnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Liliales
Familia	Asparagaceae
Subfamilia	Agavoideae
Tribu	Agaveae
Género	<i>Agave L.</i>
Especie	<i>salmiana</i> (Otto ex Salm-Dyck)

1.2. Morfología general del agave

Los agaves son plantas que viven por periodos que fluctúan entre los 8 y 25 años, constan de una raíz fibrosa y exuberante que se combina con rizomas, tallos subterráneos que crecen cerca de la superficie de la tierra, desarrollan una yema que después de 2 o 3 años producirá un hijuelo (Fig. 1; Gurrola, 2002).

El ápice de los tallos puede ser corto, desde centímetros, o largo y erecto, con hasta tres metros de altura. En varias especies, el tallo se dobla hacia el sustrato quedando cubierto por hojas o pencas que imposibilitan su visualización. Las hojas o pencas van desde tonos verdes a azulados; usualmente son suculentas, fibrosas, carnosas y de forma ovada, lineal o lanceolada, dispuestas en espiral formando una roseta, esta disposición disminuye el calentamiento de la lámina foliar debido a la sombra que se genera. Las pencas mantienen la rigidez durante los periodos de pérdida de agua gracias al abundante desarrollo de fibras en los tejidos, evitando que se deformen, función complementada con la presencia espinas en los márgenes de la hoja (García-Mendoza, 2007).

La mayoría de los agaves son monocárpicos multianuales, florecen una vez en su vida y posteriormente mueren. La edad de la floración depende de la especie o variedad; por ejemplo, en los magueyes cultivados, la floración regularmente se presenta entre los 8 y 12 años (Martínez, 2003). Al llegar a la floración de la yema central de la planta o cogollo (meyolote), comúnmente conocido como “piña”, se desarrolla un escapo floral de apariencia espigada llamado “quiote” cuya altura llega a superar los 5 m; este tallo floral contiene una inflorescencia. El estilo de inflorescencia separa el género en dos subgéneros: *Littaea*, donde la inflorescencia es espiciforme o rara vez en racimo, y *Agave*, donde la inflorescencia es una panícula (Gentry, 1982). Las flores se encuentran en agregados umbelados protándricos; es decir, los estambres se desarrollan antes que los carpelos, presentan un ovario efímero, seis pétalos, seis estambres largos junto al estilo y en la base del tubo se encuentran tres nectarios. La dehiscencia (apertura floral) ocurre durante la noche, fuera de este tiempo las suturas de las anteras permanecen cerradas y el polen no es viable, por lo que usualmente los polinizadores realizan la extracción del polen en horas nocturnas (Granados, 1993). Después de la polinización el ovario desarrolla una cápsula seca persistente que contiene varias semillas triangulares de aproximadamente 5 a 8 mm. El fruto es una cápsula leñosa seca trilocular y el sistema de la raíz es fibroso (Robert *et al.*, 1992; Granados, 1993).

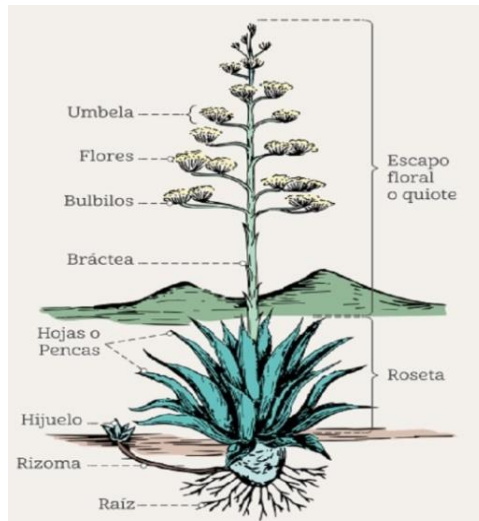


Figura 1. Morfología del agave.
Fuente: Gallardo, 2017.

1.3. Fisiología general del agave

Los agaves son considerados plantas xerófitas, por su adaptación a vivir en condiciones climáticas desfavorables. Presentan un metabolismo ácido crasuláceo, CAM por sus siglas en inglés (*Crassulacean Acid Metabolism*). Las plantas CAM presentan la fotosíntesis en dos fases (oscura y luminosa). La primera fase inicia comúnmente por la noche, la planta fija el CO₂ atmosférico a partir de la apertura estomática y rompimiento de carbohidratos en las células del mesófilo, por la reacción del fosfoenolpiruvato (PEP) con la enzima citosólica fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) que da como resultado oxoalacetato, mismo que se reduce a malato y se almacena en la gran vacuola central de las células del clorénquima, produciendo una acidificación (Winter y Smith, 1996; Magos *et al.*, 2016). Durante la segunda fase conocida como fase luminosa, los estomas se

cierran para evitar la pérdida de agua y entrada de CO₂, consecuentemente se produce una desacidificación debido a la liberación de forma pasiva del malato que se encontraba en la vacuola, mismo que por descarboxilación conduce a la formación de ácido pirúvico (compuesto de tres carbonos) debido al fosfoenolpiruvato, PEP por sus siglas en inglés, (*phosphoenolpyruvate*) y liberación del CO₂, el cual será reasimilado por la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), seguido por el ciclo de Calvin-Benson, con regeneración de carbohidratos almacenados principalmente a partir de piruvato y PEP en la gluconeogénesis (Winter y Smith, 1996).

1.4. Reproducción del agave

Este grupo es monocárpico, los individuos mueren después de la floración y producción de frutos. Su propagación puede ser vía sexual y asexual; la segunda es la forma más común para la producción masiva del maguey (García, 2007).

1.4.1. Reproducción sexual

La reproducción sexual ocurre cuando la planta alcanza su madurez fisiológica, entonces el pedúnculo floral llamado quiote desarrollará flores, las inflorescencias paniculadas comúnmente son polinizadas por murciélagos nectarívoros, contrario a las inflorescencias espigadas en las que el proceso se efectúa por insectos diurnos o nocturnos. El resultado del proceso de polinización permite que la planta genere semillas, que son dispersadas por el viento, aves, animales o al caer del pedúnculo (García-Mendoza, 2007; Gallardo y Solís, 2019).

En la producción de cultivos mediante reproducción sexual, se seleccionan plantas vigorosas y sanas. Una vez completo su ciclo biológico, las semillas se recolectan para germinarlas en almácigos, allí se les proporcionan los nutrientes necesarios y una vez que emergen las plántulas son trasladadas al campo para posteriormente ser sembradas de forma directa (Gallardo y Solís, 2019).

1.4.2. Reproducción asexual

La reproducción asexual es la más común en agaves, consiste en la producción de clones en la base de la roseta o en la inflorescencia. Los hijuelos o estolones crecen a través del rizoma (tallo horizontal y subterráneo de la planta madre), producen raíces y secuencialmente crecen de manera independiente. Los hijuelos intrafoliares se originan entre las hojas de la roseta y se desarrollan cuando se desprenden de la planta madre. Cuando emergen en la inflorescencia brotando por medio de yemas se llaman bulbillos y si lo hacen por medio de escapeo floral (quiote) o en la cabeza del agave (rametos) son cosechados y tratados de la misma manera que las plántulas obtenidas por germinación de semillas (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2007; Gallardo y Solís, 2019).

1.5. *Agave salmiana*

Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck, conocido como “maguey manso”, es una planta endémica de México que se distribuye en los estados de México, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, entre otros. Es una especie monocotiledónea, robusta con raíz fibrosa, tallo pequeño y grueso, hojas verdes a grisáceas, carnosas, con ápice color verde oscuro, espinas marginales, espina terminal de 5 a 8.5 cm de largo.

Las hojas o pencas, pueden ser lanceoladas, dispuestas en forma de roseta; del ápice central surgirá un quiole que dará lugar a inflorescencias paniculadas y semillas negras triloculares (Granados, 1993; Rangel y Galván, 1992). La especie se establece desde los 1,200 hasta los 2,460 m sobre el nivel del mar (msnm), requiere temperaturas medias anuales de 13 a 18 °C, con una máxima de 42 °C y mínima de -9 °C. Las precipitaciones de la zona de crecimiento van de los 200 a los 400 mm anuales. Los magueyes requieren ser establecidos en áreas donde obtengan bastante luz, en suelos con profundidades mayores a 50 cm, con textura franco arcillosos o areno-limoso, bien drenados y con pH de 7.3 a 8.0 en zonas de lomeríos y planicies (Nieto-Aquino *et al.*, 2016).

A. salmiana es una de las especies que mayormente se utiliza en la producción de pulque en México, sus características y propiedades son ampliamente explotados para la obtención de diversos productos y subproductos.

1.5.1. Variedades de *A. salmiana*

A. salmiana* var subsp. *crassispina

A. salmiana var. subsp. *crassispina* presenta una altura de entre 80 y 120 cm de altura, sus hojas son elípticas o ensiformes de 70 a 100 cm de largo con márgenes córneos en los ápices, el resto de la hoja es dentada con separaciones entre sí de 2 a 4 cm, el ápice es acuminado y la espina terminal es subulada, mientras que la inflorescencia es paniculada con flores amarillas y brácteas de la inflorescencia carnosas con tonalidad verde (Gentry, 1982).

A. salmiana* var. *ferox

La planta alcanza su edad adulta aproximadamente a los 12 años, esta variedad de apariencia robusta puede llegar a tener hasta 70 hojas que llegan a medir 80 cm de ancho y 2 m de largo; sus espinas laterales son pequeñas, usualmente con separación entre sí de 3 a 6 cm, mientras que la espina terminal es alargada y delgada. La variedad llega a producir de 3 a 8 hijuelos, se desarrolla principalmente entre los 2,300 y 3,000 msnm en climas semiáridos y templados (Nieto-Aquino, *et al.*, 2016).

A. salmiana* var. *salmiana

El color de la planta es verde ámbar, presenta hojas rectas y angostas que pueden medir hasta 35 cm de ancho y hasta 2 m de largo en su edad adulta; sus espinas son laterales rectas distantes en 1 a 3 cm, llegando a medir hasta 2 cm de largo, en promedio produce de 25 a 45 hijuelos. Se encuentra en climas semiáridos y templados, en suelos pedregosos y arcillosos entre los 2,000 y 2,500 msnm (Nieto-Aquino, *et al.*, 2016).

A. salmiana* var. subsp. *tehuacanensis

Presenta de 20 a 30 hojas por roseta de 50 a 70 cm largo, ampliamente oblanceoladas a espatuladas, erectas a recurvadas y cóncavas hacia la parte media, el ápice es corto-acuminado, las pencas presentan dientes con distancias entre sí de 2 a 4 cm, la espina terminal es de 1 a 3 cm de largo; las flores tienen estambres con filamentos de 5 a 7 cm largo, cápsulas oblongas, rostradas, leñosas y sus semillas son triangulares de tonalidad negra (Gentry, 1982).

Cabe mencionar que las especies descritas en la tabla 2 (Gentry, 1982; González, 2005; Nieto-Aquino, *et al.*, 2016), solo son algunas de las diferentes variedades de *A. salmiana* presentes en el estado de Hidalgo, existen otras tales como *A. salmiana* var. *angustifolia*, *A. salmiana* var. *cochlearis*, *A. salmiana* var. *gracilispina* o *A. salmiana* var. *recurvata* (TROPICOS, 2022).

Tabla 2. Variedades de *Agave salmiana*

	<i>A. salmiana</i> var. <i>subsp. Crassispina</i>	<i>A. salmiana</i> var. <i>ferox</i>	<i>A. salmiana</i> var. <i>salmiana</i>	<i>A. salmiana</i> var. <i>subsp. tehuacanensis</i>
Altura de la planta (cm)	80 a 150	100 a 150	130 a 180	200 a 300
Número de hojas	10 a 20	NR	20 a 40	20 a 30
Ancho de hoja (cm)	12 a 18	24 a 27	22 a 26	30 a 40
Largo de hoja (cm)	70 a 100	70 a 90	100 a 120	50 a 70
Forma de hoja	Elípticas o ensiformes	Elípticas	Lanceoladas, elípticas, rígidas, lisas, verde oscuro o glauco	Ob lanceoladas a espatuladas, erectas a recurvadas y cóncavas en parte media
Ápices	Sigmoidal, largamente acuminado con márgenes córneos	Sigmoidal con márgenes córneos de 1 a 2 mm de ancho, fuertemente crenados	Sigmoidal con márgenes córneos de color café oscuro, café grisáceo o café rojizo	Cortos y acuminados
Espina terminal	Subulada, de 6 a 8 cm	Subulada de 6 cm, rígida de color café rojizo, de 23 a 25 cm de largo	Subulada de 5 a 6 cm	1 a 3 cm de largo
Espinas marginales	Deltoides o triangulares con bases anchas, rectos o curvos hacia abajo, separados entre sí 2 a 4 cm	Deltoides o triangulares rectos a curvados hacia abajo, separados entre sí 2 a 4.5 cm	Deltoides con bases anchas y ápices rectos, curvados separados entre sí 2 a 6 cm	Distancias entre sí de 2 a 4 cm
Flores	6 a 8cm de largo, amarillas	6.5 a 7.5 cm de largo, amarillas o verdes	8 a 11 cm de largo, amarillas o verdes	Amarillas o verdes
Número de hijuelos	NR	3 a 8	25 a 45	NR

NR: No reportado.

1.5.2. Servicios ambientales que ofrece el cultivo de *A. salmiana*

Los servicios ambientales que ofrece el agave son diversos, entre ellos el mantenimiento de la fertilidad del suelo, reducción de la erosión mediante el aporte de material orgánico al suelo, reciclaje de nutrientes, conservación del agua al favorecer la infiltración, captura de carbono, conservación de la biodiversidad en paisajes fragmentados, entre otros (Beer, 2003).

Por su sistema radicular y morfología en terrazas y zanjas contribuye a retener agua y alimentar los mantos freáticos. Debido a la cantidad de biomasa que posee, tiene la capacidad de almacenar agua, además de contribuir con la captación de CO₂, gracias a su metabolismo tipo CAM (Narváez *et al.*, 2016).

No solo es útil para delimitar terrenos, sino también constituye por sí mismo una cerca viva que protege de plagas y vientos, además de ser eficiente para formar suelo agrícola (Ruvalcaba, 1983). Normalmente entre magueyes crecen árboles frutales, nopal y otras especies de árboles o plantas de interés, generando sistemas agroforestales. La NOM-007-REC-NAT-1997 reconoce al maguey como un recurso forestal no maderable y establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de ramas, hojas o pencas, flores, frutos y semillas (Narváez *et al.*, 2016).

El agave es capaz de atraer animales e insectos que son benéficos para los cultivos, por ejemplo, abejas, colibríes, avispas, palomillas y murciélagos, éstos últimos desempeñan un papel en la polinización y control de las poblaciones de insectos y algunos roedores (Beer, 2003).

1.5.3. Explotación comercial de la planta y derivados de *A. salmiana*

1.5.3.1. Historia de la explotación de *Agave salmiana*

El maguey denominado como “árbol de las maravillas” por José Acosta en el año de 1590 (Becerra, 1988), ha sido una planta ampliamente aprovechada desde tiempos muy antiguos como fuente de alimento, vestido, uso religioso, ornato, muebles, herramientas, medicina, construcción, gastronomía que incluye bebidas, entre otros. Existen indicios de la coexistencia del hombre mesoamericano y los magueyes desde hace 10,000 - 8,000 años a. C. (Mora-López *et al.*, 2011) como lo atestiguan restos de hojas mascadas y fibras encontradas en cuevas de Coahuila y el Valle de Teotihuacán (García, 1992).

En México, la agricultura prehispánica practicaba rotación de cultivos para el manejo y la conservación del suelo, los sistemas agrícolas de magueyes en terrazas con pendiente permitían la conservación del agua y evitaban la erosión del suelo, se empleaban como cercas vivas, además de que proporcionaban una gran diversidad de productos de importancia para las familias (García, 1992).

El códice Florentino de la época colonial ilustra cómo se sembraba el maguey a la llegada de los españoles a México (Parsons y Parsons, 1990). *Metl* en náhuatl era el nombre genérico con el que se referían a los agaves, mismos que los españoles llamaron maguey. El *octli* o pulque era la bebida sagrada de los indígenas, degustada principalmente en fiestas o ritos (Corcuera, 2013). El pulque se

deriva de *polihqui*, voz indígena que significa vino descompuesto o de mala calidad, el cual no era apto para beberse.

El pulque se consideraba desde nuestros ancestros como una bebida reservada únicamente para dioses, reyes, sacerdotes y guerreros. El origen mitológico descrito en el texto antiguo de origen náhuatl “*Histoire du Mexique*” relata que la diosa Mayahuel, quien vivía en el cielo junto a su abuela *tzitzímitl* y sus hermanas las *tzitzimime*, poseía una planta mágica capaz de dar alegría a los seres humanos. Los dioses, al tener conocimiento de los poderes de la planta le encomiendan al dios del viento, Ehécatl, la misión de traerla consigo para el disfrute de todos los hombres. Durante su travesía, el dios del viento convence a Mayahuel de escapar del cielo, sin autorización de la abuela, y partir juntos hacia la tierra. La abuela *tzitzímitl*, al enterarse de la huida de su nieta, envía a las *tzitzimime* para matarlos. Durante la persecución, Mayahuel decide cambiar la forma de ambos por la de la planta mágica para evitar la misión encomendada a las hermanas; sin embargo, al resaltar la belleza única de Mayahuel de entre todas las plantas, es identificada rápidamente por las *tzitzimime*, quienes la destrozan completamente. Ehécatl, quien logra sobrevivir y retornar a su forma original, toma los restos de Mayahuel y los siembra en la tierra. Es así como con el paso del tiempo, resurge nuevamente la planta mágica, sin que Mayahuel recobre nunca su forma original, quedando para siempre como el sagrado maguey o agave (Olivier, 2012).

Este, junto con otros mitos, fueron considerados por los pueblos del México antiguo como factores importantes en la ingesta del pulque, mismo que solo podía ser degustado por el pueblo durante fiestas y ritos. Sin embargo, después de la conquista, el maguey pulquero pasó de convertirse en un cultivo de aprovechamiento limitado a ser ampliamente explotado por las élites dominantes de la Nueva España, cobró importancia comercial hasta la consolidación de las haciendas durante los siglos XVIII y XIX (Castro, 2006). Durante el periodo del Porfiriato, con la aparición del ferrocarril, el pulque pudo distribuirse mayoritariamente, permitiendo así el surgimiento de la “industria pulquera” como por ejemplo la Compañía Expendedora de Pulques S.A., que agrupó hacendados y empresarios de la Ciudad de México, Hidalgo, Tlaxcala y el Estado de México, siendo el más poderoso, el encabezado por Ignacio Torres, conocido como “el rey del pulque” (Ramírez, 2000). No obstante, durante esta misma etapa comenzaron las famosas campañas antialcohólicas que continuaron durante la Revolución Mexicana, afectando vías de los ferrocarriles que distribuían a la ciudad de México (principal centro consumidor del pulque) logrando así poner en jaque a la industria pulquera, esto debido a que el gobierno carrancista vinculaba a la aristocracia pulquera con el régimen porfirista (Madrigal *et al.*, 2014). Al consolidarse la reforma agraria en 1930 y disolver las haciendas, los cultivos de maguey comenzaron a abandonarse. Por si fuera poco, durante la década de 1960 surgió la industria cervecera que esparció mitos del maguey, generando una focalización del poco manejo inocuo de la planta, llevando así al colapso a la industria pulquera a principios de 1970, siendo los estados de Hidalgo, México y Tlaxcala los más afectados por la reducción de más del 60 % de la producción de maguey (Rocío y García, 2000).

1.5.3.2. Productos comerciales no gastronómicos de *A. salmiana*

A. salmiana es una planta con la que se obtienen varios productos, desde tiempos prehispánicos hasta la actualidad, los tallos se han aprovechado como madera. Las pencas frescas se ocupan como platos, mientras que las secas para cubrir techos o paredes formando jacales y así ser canales

conductores de agua. Las pencas también sirven para calentar los alimentos en los hogares a través de su combustión, ya que contienen materiales ricos en lignina presentes en paredes celulares, que tiene propiedades energéticas parecidas a los combustibles sólidos (Ruvalcaba, 1983; Fournier y Mondragón 2007).

Las púas se utilizan como agujas para cerrar los costales, como clavos y para atrapar animales ponzoñosos. El quiote se utiliza para la elaboración de un instrumento musical prehispánico y las semillas se usan como adornos corporales y juguetes (Ruvalcaba, 1983). Los frutos del maguey o cápsulas son perforados y colocados a manera de collar. De la fibra natural del corazón del maguey llamada ixtle, se manufacturan sandalias, cepillos, artesanías, telas para la elaboración de mantas, huipiles, cordones, zapatos y estropajos que ayudan a la exfoliación de la piel, entre otros derivados como bolsas, tapetes, canastas, morrales, zarapes, manteles, costales y collares (Narváez, *et al.*, 2016). Una vez seca, la piña puede utilizarse como combustible, maceta y para elaborar instrumentos musicales (Narváez *et al.*, 2016).

El uso del maguey como forraje puede ser muy variado, desde la planta completa, quiotes inmaduros, piña cruda o meyolote, pencas de las podas y bagazo de la raspa. Después de que se raspa el meyolote o piña del maguey y se extrae el aguamiel, queda un residuo gelatinoso-transparente llamado “sarro” y el “metzal” (fibra) que sirven como abono o alimento para los animales. En caso de las hojas se les retiran las espinas y posteriormente se pican para evitar que los animales ingieran fragmentos muy grandes que los puedan asfixiar. La piña del maguey o meyolote se utiliza al final como bebedero o comedero para los animales. El quiote se emplea en vigas y castillos para la construcción de techos, paredes y corrales (Hernández, 1959; Narváez *et al.*, 2016).

La inulina es también un subproducto que se obtiene de la cabeza, hojas o piña seca del agave. Al ser un prebiótico estimula el crecimiento de las bifidobacterias (probióticos), huéspedes naturales del intestino animal y humano que benefician al hospedero, al incrementar la absorción de minerales como calcio, hierro y fósforo, estimular el sistema inmunitario, ayudar en la síntesis de vitaminas y por su actividad inhibitoria de patógenos intestinales (Mitsuoka, 1982; Schrezenmeir y M. de Vrese, 2001). La inulina de agave consiste en polímero de fructosas del tipo inulina-levano, unidas por enlaces β -2,1 y β -2,6 con ramificaciones y glucosas terminales (López *et al.*, 2003; Cruz, 2008) Es un hidrato de carbono de reserva, presente en muchos vegetales, frutas y cereales (Madrigaly Sangronis, 2007). Montañez-Soto *et al.* (2011) estiman que las agaváceas mexicanas tienen en base seca un promedio de 31.5% de inulina y recientemente encontraron en *A. tequilana weber azul* un alto contenido en fibra soluble de inulina, 43.24% en la cabeza del agave y menores en la punta y base de las hojas, 2.25% y 24.52% respectivamente.

1.5.3.3. Productos comerciales gastronómicos o derivados de *A. salmiana*

Uso de pencas

La barbacoa es un platillo elaborado a base de carne de ganado bovino, ovino o caprino; además de chile y especias. Su elaboración implica un proceso meticuloso en el que se espera 10 h, las primeras cuatro se destinan a calentar el hoyo con la introducción de leña de madera maciza, usualmente de mezquite y piedras, éste es avivado mediante una bomba de aire y concentrado con placas metálicas en la entrada con el fin de caldear los tabiques del interior del horno en poco

tiempo. Una vez caliente se introduce la olla para el consomé, encima una rejilla y en la parte superior a la barbacoa, la cual desprenderá jugo que caerá en el consomé y enriquecerá su sabor (Aguilar *et al.*, 2014). Las hojas viejas (ubicadas en la parte basal de la planta) se cortan y se les retiran todas las espinas de los bordes y del ápice, éstas deben asarse para que la cutícula desprenda el sabor característico.

En la gastronomía, las pencas tostadas son consumidas como dulce, no se mastican, solo se chupan, también se utilizan para la elaboración del mixiote, especialmente en municipios de Hidalgo, tal es el caso de Apan. El mixiote es un platillo prehispánico originario de zonas centro del país, actualmente se preparan con carne enchilada de borrego cocida al vapor, marinado a base de chiles secos con verduras y envuelta en una película que se desprende de la penca del maguey pulquero (*A. salmiana*). Esta película recibe el nombre de mixiote y a ella debe el nombre del platillo (Carreño *et al.*, 2013).

Uso de las flores

Cuando el agave alcanza la edad de entre 12 y 15 años, el pedúnculo de la inflorescencia o quiote emerge y llega a alcanzar hasta 12 m de altura, en la punta se dan los “gualumbos” o flores de maguey, éstos inicialmente presentan un color verde y posteriormente se tornan de un color amarillento y su sabor es amargo. Cuando los gualumbos son de color verde y se encuentran aún en botón, se hierven o se tatemán, retirando el pistilo y los estambres para su posterior preparación. En lugares como Hidalgo, Puebla o Morelos se consumen fritas, en quesadillas, tatemadas con huevo o a la mexicana (Granados, 1993; Nobel, 1998; Vásquez, 2006).

Uso de la piña

Del pulque y aguamiel se pueden elaborar platillos como atoles, tamales y pan. El aguamiel deshidratado produce una miel de alto valor nutritivo que se puede utilizar para preparar mermeladas, galletas, atoles, agua de sabores y artículos para el cuidado de la piel (Aguilar *et al.*, 2014).

El agave tarda de 8 a 15 años para alcanzar la etapa de madurez y poder ser aprovechado ampliamente por los agricultores. Para que el maguey pueda ser capado tiene que estar al “hilo”, que es cuando las hojas que cubren al meyolote o cogollo comúnmente llamado “piña” se hacen más delgadas, para ello se busca la cara (área donde tiene menor cantidad de pencas), se abre la puerta o capa en forma de triángulo, se retiran de 3 a 4 pencas, y una vez descubierto el corazón, se hace un corte horizontal profundo con cuchillo con la finalidad de retirar el tronco sin lastimar las pencas que lo rodean, evitando que nazca el quiote o pedúnculo de la inflorescencia. La siguiente parte del proceso se realiza con un “partidor”, herramienta en forma de barreta que ayuda a devastar el tronco con la punta afilada, se retira cualquier residuo de las pencas del corazón y del quiote. Posteriormente los agricultores lo cubren con una piedra y lo dejan añejar o como comúnmente lo llaman “amacizar” ya que mientras más sea el tiempo de espera la calidad será mejor y de ésta dependerán los grados de alcohol que contenga el aguamiel. Transcurrido el periodo de añejamiento se pica y se dejan restos de las pencas en el centro de la planta para después iniciar a raspar. Si se raspa una sola vez el producto se hace ligeramente amargo, para evitar esto se realizan cortes dos veces al día, en la mañana y en la tarde, durante cinco meses para abrir los poros de la planta

generando un líquido dulce y ligeramente astringente llamado aguamiel que, con ayuda de la cuchara llamada “ocaxtle” o raspador (Fig. 2), se retira el metzal y se extrae el aguamiel con ayuda de los guajes o acocotes (Aguilar *et al.*, 2014).



Figura 2. Raspador, herramienta para realizar el capado, Epazoyucan, Hidalgo.

Fuente: Autoría propia.

El aguamiel extraído por los tlachiqueros se lleva a un contenedor, el cual se alimenta constantemente con el aguamiel extraído a diario. El proceso de fermentación se lleva a cabo gracias a los microorganismos nativos como levaduras, bacterias lácticas, bacterias productoras de etanol que se encuentran en el aguamiel. Estos microorganismos transforman de manera natural parte de los azúcares presentes en el aguamiel; sin embargo, el proceso se acelera por la adición de un inóculo iniciador llamado “semilla” (la semilla será el líquido color café claro que se asentará en la base del contenedor y el pulque será la sustancia blanquecina superficial del contenedor) (Breña *et al.*, 2010). Los pequeños productores compran su semilla (pulque ya fermentado) y la utilizan como acelerador de la fermentación, esta semilla la conservan en vitroleros y se adiciona un 50% de aguamiel para ser fermentada. Por ejemplo, si son 10 L de semilla se agregan 5 L de aguamiel, aunque hay productores que sólo adicionan el 20% de aguamiel. Esta semilla se cambia cada mes. El tiempo de fermentación puede durar de 12 a 48 h a 25 °C, cuidando que los recipientes no tengan ninguna sustancia (detergentes, perfumes, desinfectantes, entre otros) que inhiba a los microorganismos mesofílicos (Hernández, 2012).

Para acelerar la fermentación de aguamiel a pulque, se utilizan cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Lactobacillus* y *Leuconosto mesenteroides* que le dan un aspecto lechoso al pulque, condición para pasarlo a los tinacales hechos de fibra de vidrio (Fig. 3), en los cuales se deja reposar de 8 a 20 días, para su posterior comercialización (Aguilar *et al.*, 2014). El tiempo depende de la rapidez de fermentación y de las características organolépticas deseadas. Anteriormente los tinacales eran de cuero de res, hoy en día son de fibra de vidrio.



Figura 3. Extracción y fermentación de agua miel.
 A) Metzal, B) Tinacales, Epazoyucan, Hidalgo.
 Fuente: Autoría propia.

Aprovechamiento culinario de plagas de *A. salmiana*

Los productores de los llanos de Apan aprovechan del maguey algunos tipos de insectos: los chinicuiles (*Comadia redtenbacheri*), los gusanos blancos, (*Acentrocne hesperiaris* W.) y los escamoles (*Liometopum apiculatum* M.), estos gusanos se comercializan en fresco y congelado, para el caso del gusano rojo también asado. El maguey es un hospedero indispensable para el ciclo de vida y hábitat necesario de las especies de insectos citados (Luna, 2012).

En náhuatl chinicuil proviene de chilocuulin o “gusano de chile”, éste se prepara tostado y se acompaña con diferentes salsas o chile molido, limón y sal, también se consumen vivos o en salsas acompañando platillos, como el filete bañado en salsa tejoloteada de chinicuiles o procesando este gusano en polvo para la elaboración de dulces tradicionales de caramelo. Los chinicuiles (*Comadia redtenbacheri*) provienen de la oruga de una polilla (*Cossidae*). A pesar de ser una plaga para el agave, son muy valiosos en la gastronomía hidalguense por ser considerado alimento ancestral y actualmente tipo gourmet. Para su obtención, los agricultores dejan proliferar la plaga en los meses de julio, agosto y septiembre; los chinicuiles atacan en temporadas lluviosas a las especies *A. angustifolia* y *A. salmiana*, royendo tallos y hojas hasta alcanzar la parte interna. Los chinicuiles proliferan en las raíces por lo que se extrae toda la planta para escoger los ejemplares necesarios (Domínguez-Rosales, 2009).

Los gusanos blancos son insectos en estado de larva, son la principal plaga del *A. lechuguilla*, provienen de la oruga de mariposa *Acentrocne hesperiaris* K. Se extraen de los magueyes que presentan marchitamiento en las pencas, normalmente durante meses de calor (mayo –junio). Se encuentran debajo de las pencas, en áreas cercanas al tronco y por lo regular se encuentran de 3 a 4 gusanos blancos como máximo. Son consumidos en diversos platillos, se doran y acompañan con limón y sal como aperitivo o en guacamole (Rodríguez *et al.*, 2017).

1.5.4. Manejo agronómico de plantaciones de *A. salmiana*

Selección del terreno

El maguey se desarrolla en cualquier configuración topográfica que va desde terrenos planos en laderas o muy pronunciadas en terrenos pedregosos y/o rocosos. Para una plantación de tipo comercial se sugiere que ésta se realice en áreas de uso agrícola que presente buen drenaje, suelos profundos y con características semejantes al sitio de donde extrajo el material de plantación (González, 2009; Aguilar *et al.*, 2014).

Preparación del terreno

La preparación usual del terreno es entre los meses de febrero y marzo. Si se desea plantar en el terreno definitivo dentro de las labores agrícolas se aconseja el subsoleo, el cual consiste en la fragmentación de manera vertical de los horizontes del suelo, con ello se consigue facilitar el drenaje del agua, evitando encharcamientos, logrando propiciar el desarrollo radicular a profundidad del cultivo. Como segundo paso se realizan barbechos a una profundidad de 20 a 25 cm para facilitar la extensión del sistema radicular de las plantas de maguey (González 2009).

En caso del laboreo con rastra se restringe a áreas de planicie y a viveros de plantación, ya que este se encarga de unificar la tierra, mulléndola y dejando la primera capa del suelo en terrones pequeños que permiten el anclaje de la planta. Al final se hace el trazado de líneas donde se trasplantarán los hijuelos (González, 2009; Aguilar *et al.*, 2014).

En terrenos con pendientes pronunciadas se recomienda generar curvas de nivel; para ello, se preparan bordos a una altura considerable para captar la mayor cantidad posible de humedad y evitar la erosión del suelo (González, 2009).

Abonado con estiércol

El maguey es una planta que por lo regular no se le da ningún manejo; sin embargo, en caso de no contar con nutrición o programa de fertilización, el área de cultivo se puede abonar con estiércol composteado para contribuir con el aporte de nutrientes y mejorar la textura del suelo. Aproximadamente se aplica una fertilización de 4 a 6 kg de estiércol por planta (González, 2009).

Selección y preparación de hijuelos

Para la selección de hijuelos se eligen plantas sanas que presenten buena forma de la roseta, cogollos rectos, libres de plagas y enfermedades, mismos que se trasplantan a los 2 años de edad, de preferencia deben tener un tamaño uniforme para su mejor manejo. Los vástagos se separan de la planta madre cuando alcanzan una altura mínima de 28 o 30 cm (Aguilar *et al.*, 2014).

El arranque de los hijuelos se lleva a cabo mediante una barreta con la cual se corta el rizoma que une al hijuelo con la planta madre, este corte se hace de un solo golpe, limpio y transversal al rizoma. Inicialmente se eliminan las hojas basales a dejar 3 o 4 de la roseta central, proceso conocido como “despencado”, posteriormente se realiza el “babeo” que consiste en recortar raíces a 1 cm de longitud para que crezcan otras nuevas (González, 2009).

Escurrimiento

Una vez preparada la planta, ésta se deja cicatrizar por espacio de 15 días a media sombra y se establecen en vivero cuando tengan de 2 a 3 años o 1 m de altura. En caso de campo abierto, se expone la planta a radiación solar durante un periodo de uno a tres meses antes de plantarlas en el terreno, este proceso es conocido como “escurrimiento” debido al tiempo de reposo o exposición al sol que estimulan la síntesis de hormonas tales como las auxinas, responsables en la generación de raíces (Ramos-Zablah, 2004; González, 2009).

Plantación

Existen distintos tipos de plantaciones, así como arreglos topológicos que se emplean, éstos se seleccionan por los productores según los espacios disponibles, áreas de terrenos y fines que deseen aplicar (Aguilar *et al.*, 2014; Nieto-Aquino *et al.*, 2016).

Las plantaciones tipo melgas anchas se utilizan para delimitar las parcelas, en terrenos de pendientes de 0 a 50% y se inicia con la formación de bordos de dimensiones de 1.5 m de base por 60 cm de cresta. La plantación se realiza en la parte más baja del bordo a una distancia entre plantas de 2 m, posteriormente se entierra aún más la planta para reforzar el bordo. El marco de plantación puede variar, en hileras anchas con una separación de 1.5 m a 3 m y entre planta-planta, mientras que en otras pueden tener 2 m de distancia entre hilera-hilera (Nieto-Aquino *et al.*, 2016).

En predios de 50 a 70% de pendiente, el diseño de la plantación recomendable es de tres bolillos, ya que ayuda a evitar la erosión de suelo, el trazo en forma de triángulo se marca de 3.4 y 5 m por lado. En plantaciones con alta densidad de población se requieren terrenos con escasa pendiente (0.5%), en los cuales comúnmente se emplea marco real (4 × 4 m o 4 × 3 m), diseño que permiten llevar a cabo las labores culturales de manera más eficiente. Generalmente los productores asocian los agaves con otros cultivos como cebada, alverjón, avena, haba y maíz (González, 2009).

El periodo de plantación más adecuado es de abril a junio, para aprovechar todo el ciclo de lluvias y facilitar el establecimiento de las plantas, después de que se tiene preparado el área del terreno se siembra manualmente con un azadón de cabo corto, posteriormente se entierra tres cuartas partes de la piña y se apisona la tierra alrededor de la planta para que el viento no la tumbe (González, 2009; Aguilar *et al.*, 2014).

Poda y deshierbe

La poda es una de las labores que ayudan a que la planta adquiera mayor vigor con rapidez en su crecimiento a partir de la eliminación de hojas seniles con poca eficiencia fotosintética, por lo que regularmente se eliminan de 3 a 4 pencas de la base del maguey. Esta actividad se implementa a partir del segundo año de establecimiento de la plantación y se acompaña de un continuo deshierbe para eliminar malezas (González, 2009; Aguilar *et al.*, 2014).

Fertilización

En caso de que el suelo no cuente con abono previo, éste se puede incorporar en la planta, dando la ventaja de que se utiliza en menor cantidad, minimizando así los gastos de producción. Existen

diferentes abonos orgánicos, dentro de los estiércoles podemos encontrar el de conejo, ganado bovino, caprino, guano, entre otros, mismos que deben pasar por un proceso de solarización antes de ser aplicado. Este procedimiento consiste en cubrir el estiércol con un plástico y exponerlo al sol por un período de 15 a 20 días con la finalidad de eliminar malezas, insectos o patógenos (González, 2009; Aguilar *et al.*, 2014).

Para incorporar el abono, inicialmente se realiza el “banqueo” o zanjas alrededor de la planta con una profundidad de 15 cm y aproximadamente de 10 a 20 cm de distancia de los hijuelos, dentro de ésta se distribuye uniformemente el estiércol y posteriormente se cubre con el suelo previamente removido. Se sugiere utilizar en dosis de 4 kg por planta (INIFAP, 2006).

Si se desea un programa de fertilización más sofisticado, la fórmula de fertilización NPK recomendada es de 70–46–30 por hectárea, en el que se incorpora 150 kg de urea (46%), 100 kg de superfosfato de calcio triple (46%) y 50 kg de cloruro de potasio (60%), en dosis de 150 gramos por planta (Nieto-Aquino *et al.*, 2016). Estos datos pueden variar según el área de siembra, debido a que cada suelo tiene diferente cantidad de nutrientes, por lo que puede requerir menor cantidad de macro y micronutrientes, para mayor exactitud se recomienda realizar análisis de suelos, mismos que ayudarán a identificar valores de pH, conductividad eléctrica, contenido de materia orgánica, contenido y cantidad de nutrientes minerales y metales. Los rangos de pH óptimos usualmente se manejan de 6.5 a 7; sin embargo, los magueyes pueden establecerse en pH variados (González, 2009).

Se debe considerar el método de fertilización, el más común es el manual con fertilizantes granulados; sin embargo, también pueden ser abonos líquidos aplicados en sustrato o foliar; en caso de suelos arenosos con buen drenaje no se recomienda en sustrato ya que éstos se lixivian fácilmente. En terrenos pedregosos se dificulta el manejo de fertilizadoras mecánicas, por lo que el tipo de suelo también se considera, así como la naturaleza del producto a aplicar si es de liberación lenta o rápida, ya que indica la disponibilidad en la que se tendrá el producto (González, 2009; Aguilar *et al.*, 2014).

1.5.5. Problemas fitosanitarios *A. salmiana*

1.5.5.1 Plagas del agave

Existen distintos tipos de plagas que afectan al maguey, dentro de las más comunes encontramos al picudo de maguey (*Scyphophorus acupunctatus*), gallinita ciega (*Phyllophaga spp*), grana cochinilla (*Dactylopius coccus*), entre otros.

Según el tejido donde generen daños, pueden clasificarse como plagas de raíz, plagas de cabeza, hojas o cogollo (Valenzuela, 1997), tal como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Plagas asociadas al agave

	Nombre común	Nombre científico del agente causal
Plagas de raíz	Gallinita ciega	<i>Ciclocephala spp.</i> , <i>Macroductylus spp.</i> <i>Phyllophaga spp.</i>
	Diabrotica	<i>Diabrotica spp.</i>
Plagas de cabeza	Picudo del agave	<i>Scyphophorus acupunctatus</i>
	Barrenador	<i>Acentroneme hisperiaris.</i>
	Barrenador de la penca del agave	<i>Agathymus rethon</i>
	Escarabajo funerario	<i>Acanthoderes funeraria</i>
Plagas de las hojas	Escama armada	<i>Acutaspis agavis</i>
	Grana cochinilla	<i>Dactylopius coccus</i>
	Piojo harinoso	<i>Pseudococcus agavis</i>
	Chapulines	<i>Caelifera</i>
Plagas de cogollo	Trips	<i>Frankliniella occidentalis</i>
	Pulgones	<i>Rhopalosiphum maidis</i>

1.5.5.2. Enfermedades del agave

La enfermedad puede definirse como cualquier alteración ocasionada por un agente patógeno o un factor ambiental que interfiere con el proceso natural de la planta. La enfermedad puede clasificarse según la sintomatología que ocasione (pudriciones de raíz, chancros, marchitamiento, manchas foliares, amarillamientos, etc.), de acuerdo al órgano afectado (raíz, tallo, hojas o frutos) o con base a los tipos de planta afectados (enfermedades de los cultivos mayores, hortalizas, frutales, etc.); sin embargo, el criterio más útil es por el agente causal (nematodos, protozoarios, virus, plantas superiores parasitas, micoplasmas, bacterias u hongos) (Agrios, 1998).

Las enfermedades de mayor incidencia en el agave son causadas principalmente por hongos y bacterias (Tabla 4), cabe mencionar que existen distintos tipos de agentes causales que al ser saprófitos y no tener un hospedero fijo, éstos pueden afectar distintos cultivos (Valenzuela, 1997).

Tabla 4. Enfermedades asociadas al agave

Agente causal	Nombre común	Nombre científico
Bacteria	Anillo Rojo	<i>Erwinia</i> sp.
	Marchitez bacteriana	<i>Erwinia</i> sp.
Hongo	Negrilla	<i>Asternina mexicana</i>
	Marchitez del agave	<i>Fusarium oxysporum</i>
	Pudrición de raíz	<i>Phytophthora</i> sp.
	Mancha anular	<i>Didymosphaeria</i> sp.
	Mancha gris o Tizón foliar	<i>Cercospora agavicola</i>
	Mancha anillada de maguey pulquero	<i>Coniothyrium concentricum</i> , <i>Phoma</i> sp., <i>Alternaria alternata</i> y <i>Colletotrichum agaves</i> .
	Tizón	<i>Alternaria agavi</i>
	Antracnosis	<i>Colletotrichum agave cav.</i>
	Fumagina	<i>Capnodium</i> sp
	Punta seca	<i>Fusarium</i> sp.
Nemátodo	Nemátodos	<i>Dorylaimus</i> sp
	Nemátodos	<i>Helicotylenchus</i> sp
	Nemátodos	<i>Pratylenchus</i> sp

1.6. Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades

El Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades, conocido también como MIPE se basa principalmente en mantener un umbral bajo en la población de agentes patógenos en el que no ocasionen daños a los cultivos, su principal meta es reducir el daño económico y estético causado, busca conjugar las ventajas de los diferentes métodos de control bajo un enfoque preventivo, es decir, realización oportuna de prácticas agrícolas. Para ello se debe tener un calendario de posibles patógenos que puedan llegar a afectar al cultivo durante ciertas temporadas y aplicar algún método de control preventivo, antes de que éstas ataquen, cabe mencionar que, para ello, se debe tener conocimientos de las características de la plaga o enfermedad, tales como el ciclo de vida, factores abióticos, entre otros, que les permitan tener condiciones favorables para incidir en el hospedero (Maloy, 2005; Morishima, 2010).

Los procedimientos del manejo de enfermedades mantienen el nivel del daño de enfermedades y plagas por debajo del límite económico aceptable, combinando varias formas de control, tales como:

Control cultural: Se basa en implementar prácticas o técnicas agrícolas modernas o tradicionales principalmente preventivas para la protección del cultivo. Éstas pueden ser rotación de cultivos, uso de plantas compañeras que beneficien con aporte de nutrientes o alejando a agentes patógenos del cultivo principal y eliminación de malezas (Maloy, 2005; Morishima, 2010).

Control mecánico: Eliminación manual de forma parcial o total de la planta o partes de ella que se vean afectadas por algún agente patógeno, después de ello se debe eliminar dicho agente, puede ser elevando la temperatura, aumentar o disminuir los riegos, implementar trampeo, generar barreras en

los cultivos como mallas sombra o cubriéndolos con plástico en caso de plagas, exponiendo las plantas a luz u oscuridad en caso de enfermedades (Morishima, 2010).

Control biológico: Se basa en la introducción de enemigos naturales del agente patógeno que ataca al cultivo (Maloy, 2005). Éstos pueden ser: parásitos, entomopatógenos, depredadores y competidores. Los parásitos son organismos que entran al cuerpo (endoparásito) de otro organismo o habitan en la superficie (ectoparásito) y comen dentro del hospedero, Los entomopatógenos son microbios (hongos, bacterias o virus) que causan enfermedad en el agente patógeno que ataca el cultivo. El predador es un animal que se come a otro animal y los competidores son microbios que compiten con otros microbios e impiden su crecimiento (Morishima, 2010).

Control químico: Este método usualmente se implementa cuando la plaga o enfermedad ha rebasado los límites permisibles de daño en el cultivo, se basa en la aplicación de productos que contengan ingredientes activos que permitan inhibir o erradicar al agente patógeno, las aplicaciones y dosis son por instrucciones de fabricante, estos pueden ser insecticidas, fungicidas, bactericidas o virucidas (Maloy, 2005; Morishima, 2010).

La aplicación de los métodos de control antes mencionados son eficientes; sin embargo, el manejo y uso indiscriminado del control químico, en particular los pesticidas han generado daños al medio ambiente como la pérdida de biota, toxicidad en el suelo o eutrofización en el agua (García-Gutiérrez y Rodríguez-Morales, 2022) al igual que daños en la salud humana, tales como dolor de cabeza, náuseas, vómito, dolor de estómago y diarrea. La intensidad de estos efectos sobre la salud depende del tipo de pesticida, grado de toxicidad, dosis de exposición, frecuencias de aplicación y medidas de protección personal (Jiménez-Quintero *et al.*, 2016).

En la búsqueda de nuevas técnicas de control, la nanotecnología se ha propuesto como una alternativa en la protección de los cultivos. Las nanopartículas de plata (AgNPs) son las más estudiadas y utilizadas contra fitopatógenos debido a sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antivirales (Gupta *et al.*, 2018). Las AgNPs, combinada con anfotericina B, fluconazol y ketoconazol, presentan un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Aziz, *et al.*, 2016). Las AgNPs no solo se pueden combinar con antibióticos, sino también con recubrimientos, por ejemplo de PVP (polímero polivinilpirrolidona), por sus siglas en inglés polyvinylpyrrolidone polymer (Bryaskova *et al.*, 2011), al igual que con extractos de plantas, tal es el caso de las AgNPs sintetizadas combinadas con extracto de hoja de *C. roxburghii*, las cuales tienen mayor efecto que el fármaco antifúngico convencional anfotericina B, contra *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Curvularia sp.* (Balashanmugam, *et al.*, 2016).

1.6.1. Propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata

Las AgNPs son objetos de tamaño nanométrico (un nanómetro es equivalente a la millonésima parte de un metro o 1×10^{-9} m), éstas poseen propiedades distintas a la plata en bulto, a pesar de compartir la misma composición de átomos, debido al aumento del área superficial al disminuir el tamaño. Distintas variables permiten obtener una mayor o menor interacción de las AgNPs con los agentes patogénicos; por ejemplo, en tamaños menores a 10 nm obtenemos mayor interacción de la nanopartícula con el agente bacteriano, mientras que en pH ácidos o en presencia de oxígeno las

AgNPs liberan más rápido iones de plata (Ag^+) (Franci *et al.*, 2015; Durán *et al.*, 2016; Anees *et al.*, 2020; Pareek *et al.*, 2020).

Las nanopartículas actúan como un agente antimicrobiano debido a su efecto inhibitorio contra diferentes especies bacterianas (Clement y Jarrett, 1994). El mecanismo exacto por el cual las AgNPs actúan sobre los microorganismos se desconoce; sin embargo, se han propuesto una serie de posibles métodos de acción. A continuación, se describen algunos de ellos:

a) Adhesión/anclaje en la pared y membrana celular

Se ha propuesto que la adhesión y acumulación de AgNPs en la superficie celular sucede principalmente en bacterias *Gram* negativas. La literatura propone la capacidad de las nanopartículas de plata para adherirse a la membrana celular bacteriana mediante la interacción electrostática entre los iones de plata cargados positivamente y la superficie de la membrana celular cargada negativamente, esto debido a la presencia de los grupos carboxilo, fosfato y amino (Netala *et al.*, 2014; Rashid *et al.*, 2017). Pal *et al.* (2007) mencionan que los lipopolisacáridos en la pared celular de las bacterias *Gram* negativas pueden contribuir con la adhesión de las AgNPs.

b) Penetración en la pared y membrana celular

Chauhan *et al.* (2016) proponen que las AgNPs atraviesan la membrana plasmática de las bacterias *Gram* negativas a través de las porinas (canales de transporte masivo de agua) presentes en las mismas, que participan principalmente en el transporte pasivo de moléculas hidrófilas de varios tamaños y cargas.

Por otro lado, las AgNPs al interactuar con grupos sulfhidrilo, por ejemplo en puentes de disulfuro en cisteínas (componente importante de muchas enzimas) o al interactuar con puentes débiles, remplazan átomos de hidrógeno que resulta en un bloqueo de la respiración y transferencia de electrones, lo que dificulta la inducción de mecanismos de rescate exitosos, conduciendo así a la desnaturalización de las proteínas (Russell y W, 1994; Gordon *et al.*, 2010) provocando un colapso de la fuerza motriz de protones, generando una disipación de la fuerza motriz de protones (PMF) y consecuentemente la destrucción de la membrana (Venkata *et al.*, 2013; Netala *et al.*, 2014).

c) Liberación de iones de plata (Ag^+)

Las AgNPs liberan iones de plata Ag^+ (Feng *et al.*, 2008) que al interactuar con grupos tiol (-SH) de enzimas bacterianas inhiben muchas funciones como la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés, adenosine triphosphate), así como la división y reproducción celular; éste y otros efectos dañan las células, que da como resultado la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Matsumura *et al.*, 2003). Así mismo la acumulación de las AgNPs en la membrana promueve la creación de pozos que permiten la entrada de las NPs generando lisis celular. Cuando éstas se unen a proteínas de la membrana al interferir con la permeabilidad se produce una fuga del contenido celular y transporte incontrolado de iones (Rodríguez-Morales, 2022).

d) Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Las ROS pueden producirse a través de la inhibición de una enzima respiratoria por parte de los iones Ag^+ liberados de las AgNPs. En organismos aerobios las ROS son el subproducto resultante de la respiración, al aumentar la concentración de los iones, éstos generan un efecto de toxicidad conduciendo al estrés oxidativo o en casos extremos pueden provocar la muerte celular (Cabisco *et al.*, 2000). Las ROS y diferentes reacciones de oxidación catalizadas por metales podrían ser la base de tipos específicos de daño en el ADN, las proteínas, ARN y lípidos (Cabisco *et al.*, 2000).

e) Interacción con el ADN

Las AgNPs pueden interactuar con los componentes mayoritarios del ADN, “azufre y fósforo”, resultando en la interrupción del crecimiento de bacterias al interrumpir la replicación del ADN bacteriano (Hatchett y Henry, 1996).

f) Modulación de la transducción de señales en bacterias

Las AgNPs desfosforilan sustratos peptídicos en los residuos de tirosina, lo que conduce a la inhibición de la transducción de señales, llevando así a la detención del crecimiento bacteriano (Shrivastava *et al.*, 2007).

1.6.2. Métodos de síntesis de nanopartículas en disolución

La síntesis de nanopartículas en disolución implica reacciones de óxido-reducción que se llevan a cabo en solución acuosa a partir de sustancias más simples, el producto es una dispersión coloidal. Por esta razón, el término común utilizado para el fenómeno es la coprecipitación, la cual implica fenómenos de reducción, nucleación, crecimiento, y/o aglomeración (Cushing *et al.*, 2004).

Las nanopartículas son objetos con dimensiones entre 1 y 100 nm, tamaños en los que usualmente las propiedades físicas y químicas de los materiales cambian en comparación con los materiales en bulto. En dicho proceso se emplea un solvente, un agente reductor y un agente estabilizador. En general, los métodos utilizados para la síntesis de nanopartículas metálicas pueden ser agrupados en dos categorías: *top-down* (de arriba hacia abajo) y *bottom-up* (de abajo hacia arriba). En *top-down* existen diferentes técnicas; por ejemplo, una de ellas es la reducción mecánica de materiales en bulto, que permite obtener estructuras de menor tamaño con nuevas propiedades, mientras que *bottom-up* es un método que permite la síntesis de nanopartículas a partir de precursores atómicos (Tadaaki, 2015).

Para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de plata en disolución, específicamente la reducción del catión metálico, se requiere de un agente precursor (sustancia que se oxida para producir otra mediante los compuestos químicos que la componen) y un agente reductor (cede electrones a un agente oxidante). En dicha reacción el cambio de energía libre debe ser negativa, el potencial de reducción electropositivo nos permite sintetizar $\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$ en agua ($E^0 = +0.799 \text{ V}$) u otras sustancias (solventes) lo que permite el uso de varios agentes reductores, como el citrato de sodio ($E^0 = -0.180 \text{ V}$) (Fig. 4), borohidruro de sodio ($E^0 = -0,481 \text{ V}$), hidracina ($E^0 = -0,230 \text{ V}$) e hidroquinona ($E^0 = -0,699 \text{ V}$), entre otros (Alarcon *et al.*, 2015).

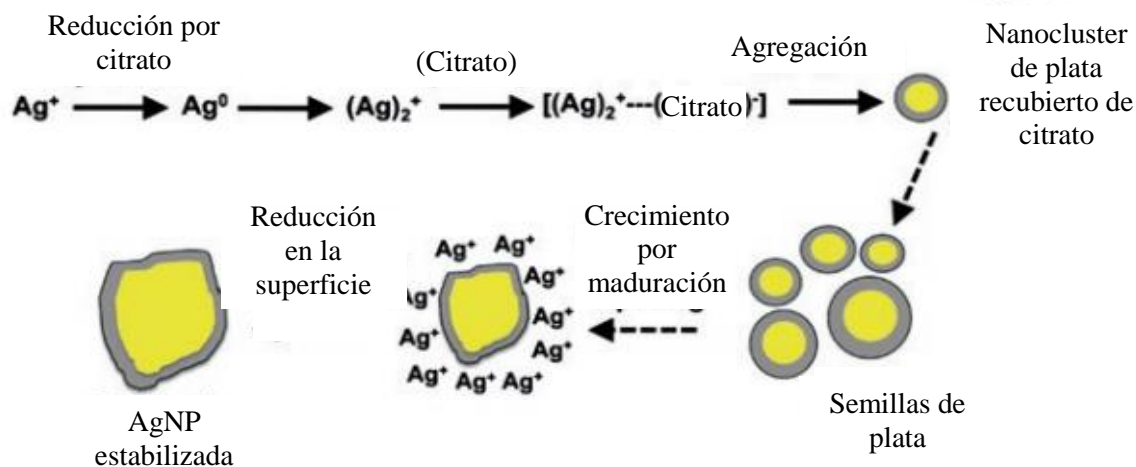


Figura 4. Mecanismos obtenidos por la síntesis de AgNPs con citrato de sodio.

Fuente: Alarcon *et al.*, 2015.

1.6.3. Métodos de caracterización de las nanopartículas

1.6.3.1. Caracterización de Espectroscopía UV-Vis

Espectroscopía UV-vis

La espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis) utiliza longitudes de onda (λ) en la región ultravioleta ($\lambda = 200\text{--}390$ nm) y visible ($\lambda = 390\text{--}780$ nm) del espectro de radiación electromagnética, esta técnica principalmente se usa para caracterizar cuantitativamente los nanomateriales, ya que interactúan con fotones para producir una variedad de efectos como oscilaciones de plasmones en la superficie de nanometales, como en el caso de la Ag^+ (Hornyak *et al.*, 2008). Tiene como principio la medición de la absorción de luz debido a transiciones electrónicas en una muestra, que promueven estados energéticos de los electrones. Después de una estimulación con calor, luz, electricidad o reacciones químicas, el analito sufre una transición de su estado base hacia un estado de excitación, dando como resultado un cambio de distribución electrónica. Cuando el electrón decae del estado excitado al estado base, se mide la radiación electromagnética emitida por el detector (Fig. 5) (Kumar, 2018).

Siguiendo la ley de Beer, la absorbancia (A) puede determinarse a partir de la intensidad de la luz incidente (I_0) y la intensidad de la luz transmitida (I), expresada en la siguiente ecuación:

$$A = \log I_0 / I = \epsilon c l = \alpha c$$

Dónde A es la absorbancia, I_0 es la longitud de la trayectoria de la muestra (luz incidente), I es luz transmitida, c es la concentración de una solución, α el coeficiente de absorción y ϵ la absorptividad molar.

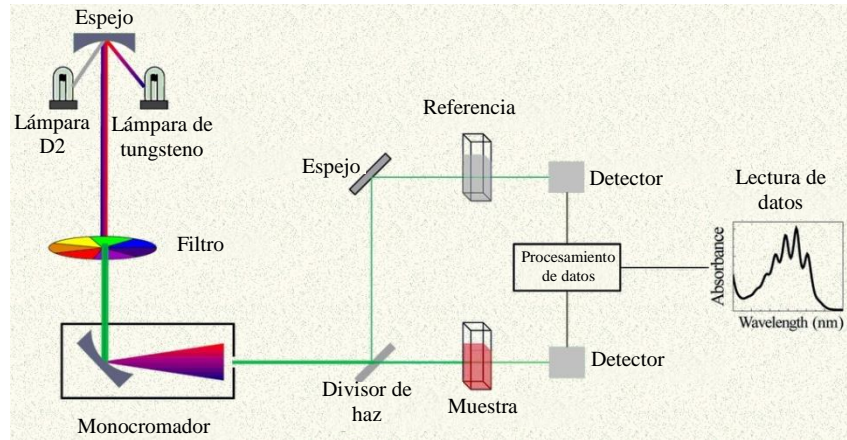


Figura 5. Representación esquemática del sistema de Espectroscopia UV-vis.
Fuente: Kumar, 2018.

Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva

La espectroscopía de rayos X dispersados (EDS), por sus siglas en inglés *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy* es una técnica implementada para determinar la especie y cantidad de elementos químicos de una muestra, así como recopilar información de la composición del material (Kumar, 2018). En la EDS el sistema del condensador genera un haz de electrones primarios que interactúa con la muestra, la cual inicialmente sus átomos se encuentran en estado de reposo y tras la interacción de los electrones primarios, éstos transfieren parte de su energía a la muestra generando así un estado de excitación en los átomos, dando como resultado la emisión de electrones secundarios, rayos X, electrones de barrena y electrones dispersos inelásticos que pasan por la muestra (Fig. 6) (Vollath, 2013).

La energía absorbida generalmente se emite como fotones de rayos X, los cuales empujan a un electrón con menor energía fuera de la muestra, mismo que es denominado "electrón Auger". Estos rayos X emitidos por los átomos de la muestra se utilizan para su análisis mediante un microanalizador (Vollath, 2013; Kumar, 2018).

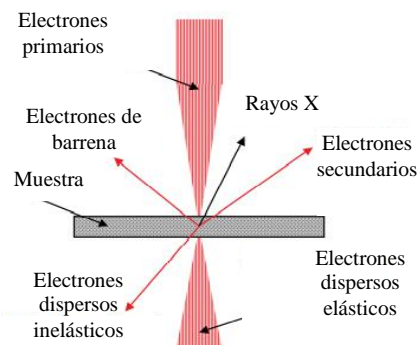


Figura 6. Espectroscopía de rayos X de Energía Dispersiva (EDS).
Fuente: Vollath, 2013.

1.6.3.2. Caracterización estructural

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés Scanning Electronic Microscopy) nos permite identificar la forma, el tamaño y la estructura de una muestra. Esta técnica implementa ondas electrónicas en lugar de ondas electromagnéticas, constan de un sistema de iluminación, un portamuestras, sistema objetivo seguido del sistema de proyección y finalmente un dispositivo de registro o detector. Éste último puede ser una placa fotográfica o un sistema de cámara electrónica (Hornyak *et al.*, 2008; Vollath, 2013).

El cañón de electrones generalmente contiene filamentos de tungsteno o hexaboruro de lantano que se encuentra en la parte superior de la columna "óptica", produce un haz de electrones que se enfoca a un diámetro de 50 Å mediante una serie de lentes magnéticas y se escanea a través de la superficie de la muestra (Fig. 7) (Hornyak *et al.*, 2008). Los electrones se dispersan en forma elástica (la energía de los electrones no se altera) e inelástica (los electrones pierden energía), esta dispersión es identificada por los detectores. Debido a que los sistemas ópticos de electrones están conectados a una aberración cromática significativa, estos proporcionan una imagen nítida (Dieter *et al.*, 2013).

La morfología de la superficie, la topografía y el análisis de la forma de las partículas se realizan mediante los detectores del SEM que recolectan la resolución de electrones dependiendo del diámetro del haz incidente, el volumen de excitación y el ángulo de incidencia del haz (Dieter *et al.*, 2013).

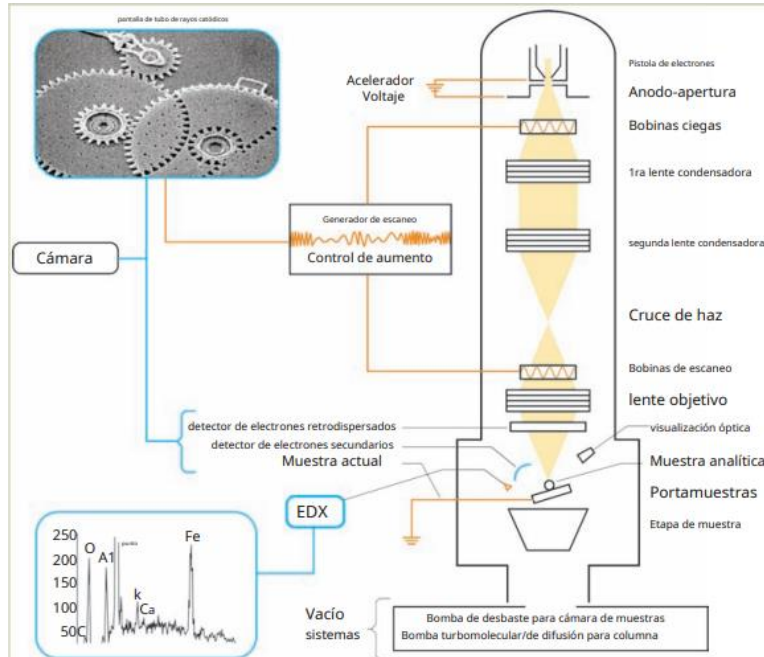


Figura 7. Representación esquemática de la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Fuente: Hornyak *et al.*, 2008.

1.6.4. Efecto toxicológico de la plata

Efecto tóxico en la salud del cuerpo humano

Un efecto tóxico se define como un efecto indeseable o adverso para la salud (James *et al.*, 2000). Para que un metal pueda generar efectos tóxicos, influyen varios factores como la solubilidad del metal, la capacidad del metal para unirse a sitios biológicos y el grado en que los complejos metálicos formados son secuestrados o metabolizados y excretados (Weir, 1979). En el caso de la plata los compuestos solubles se absorben más fácilmente que la plata metálica o insoluble (Rosenman *et al.*, 1979). Por su amplio uso y aplicaciones, la exposición al metal puede ingresar al cuerpo por diferentes rutas como ingesta, inhalación o por contacto con la piel por joyería, catéteres, amalgamas dentales, entre otras (Wan *et al.*, 1991). Los síntomas reportados por dichas rutas en caso de ingesta prolongada de dosis bajas de sales de plata son la degeneración grasa del hígado y los riñones y cambios en las células sanguíneas (Venugopal, 1978). La inhalación de compuestos de plata soluble causa irritación de las vías respiratorias como nariz y garganta, en caso de sobreexposición, la plata puede acumularse en piel, hígado, riñones, córneas, encías, en las membranas mucosas, uñas o brazos (Rosenman *et al.*, 1979; Hollinger, 1996).

La inhalación o ingestión a largo plazo de compuestos de plata soluble o plata coloidal puede causar argiria o argirosis, una pigmentación generalizada azul en la piel, ojos y uñas, por depósitos de plata coloidal en tejido.

Límites de exposición a la plata

Los límites permisibles de exposición a cualquier forma de plata son similares, en caso de la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (por siglas en inglés Occupational Safety and Health Administration, OSHA) y la Administración de Seguridad y Salud Minera (por siglas en inglés Mine Health and Safety Administration, MSHA) actualmente hacen cumplir un Límite Permissible (PEL) de 0.01 mg/m³ para compuestos de plata metálicos y solubles (OSHA, 1989; NIOSH, 2003). En el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (por siglas en inglés National Institute for Occupational, NIOSH) el límite de exposición recomendado (por sus siglas en inglés Recommended Exposure Limit, REL) es de 0.01 mg/m³ tanto para compuestos de plata solubles como para polvo de metal plateado, que no difiere del PEL de OSHA (NIOSH, 1992). En caso de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la ingesta de por vida de alrededor de 10 g de plata puede considerarse como un nivel de ingesta sin efectos adversos observables en humanos.

La Conferencia Estadounidense de Higienistas Industriales Gubernamentales fijó los límites de exposición en exposiciones ambientales y regulaciones de agua potable en 0.10 mg/L. La Comisión Europea recomendó un promedio ponderado en el tiempo de 8 h de 0.1 mg/m³ polvo de plata total como límite de exposición ocupacional (Drake y Hazelwood, 2005).

Fitotoxicidad de las AgNPs en las plantas

En las plantas, se ha propuesto que las nanopartículas pueden ser transportadas a través de los espacios intercelulares o por el tejido vascular (Ma *et al.*, 2010; Geisler-Lee *et al.*, 2013) en el que las AgNPs penetran las paredes celulares y las membranas plasmáticas de las capas epidérmicas de

las raíces, para posteriormente ingresar a los tejidos vasculares (xilema) y moverse hacia la estela, también se pueden transportar dentro de la célula vegetal a través plasmodesmos, poros de 50 a 60 nm de diámetro que conectan células vegetales vecinas adyacentes (Heinlein y Epel *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2010).

El ingreso de las nanopartículas de plata no se limita a la raíz, Larue *et al.* (2014) encontraron que las AgNPs quedaban atrapadas en las hojas de lechuga por la cutícula después de la exposición foliar, y las AgNPs penetraban el tejido de la hoja a través de los estomas. Más tarde Li *et al.* (2017) compararon la absorción de AgNPs en la soja y arroz, después de la exposición de la raíz y la foliar demostraron que la exposición foliar resultó en una bioacumulación de Ag⁺ de 17 a 200 veces mayor que la exposición de la raíz.

El potencial de crecimiento, la germinación de semillas, la biomasa y el área de superficie de la hoja son parámetros comúnmente utilizados para evaluar la fitotoxicidad de las AgNPs en las plantas (Dietz y Herth, 2011; Aslani *et al.*, 2014; Tripathi *et al.*, 2017). Kaveh *et al.* (2013) encontraron que la exposición a concentraciones de 5 a 20 mg/L de AgNPs resultó en una reducción de la biomasa en *Arabidopsis*, mientras que Nair y Chung (2014) demostraron que las AgNPs redujeron significativamente la elongación de la raíz y el peso fresco de los brotes y las raíces en el arroz.

A nivel fisiológico la fitotoxicidad en las plantas causada por exposición de AgNPs se predice mediante la reducción de la absorción de clorofila y nutrientes, la disminución de la tasa de transpiración y la alteración hormonal. Qian *et al.* (2013) demostraron que las AgNPs pueden acumularse en hojas de *A. thaliana*, disminuyendo el contenido de clorofila y conduciendo a la inhibición del crecimiento de las plantas.

2. Antecedentes

La negrilla o viruela es una enfermedad que se presenta en hojas de agave, se caracteriza por la aparición de manchas foliares de color negro. El primer agente causal que se relacionó a dicha enfermedad fue *Asterina mexicana* (Job y Matlack, 1900); sin embargo, reportes recientes han identificado molecularmente a *Curlvularia lunata* que fue aislado de hojas de *A. salmiana* con sintomatología de viruela o negrilla en el estado de Hidalgo (Hernández *et al.*, 2022).

A. mexicana pertenece al phylum Ascomycota, clase Dothideomycetes, orden Asterinales, familia Asterinaceae, género *Asterina*, especie *mexicana*. La sintomatología asociada al agente causal incluye manchas foliares de tonalidades negras en ambas caras de la penca de *A. salmiana*, que en casos severos puede resultar en muerte (Díaz-Martínez, 2019).

Una sintomatología similar también es causada por *C. lunata*, agente que causa la enfermedad de la mancha foliar en maíz, el cual pertenece al phylum Ascomycota, clase Dothideomycetes, orden Pleosporales, familia Pleosporaceae, género *Cochliobolus*, especie *lunatus*. Su teleomorfo *C. lunatus* se forma cuando el patógeno sufre una condición de estrés, los signos primarios son manchas marrones, ovoides redondas con un halo clorótico, distribuidas uniformemente sobre el área foliar, cuando éstas crecen cambian a tonalidad negro pardusco y se fusionan, produciendo sintomatología de márgenes amarillos y marchitez (Gao *et al.*, 2012),

C. lunata desarrolla hifas septadas, ramificadas, subhialinas a pardas, lisas a asperuladas, de aproximadamente 1.5 a 5 μm de ancho, conidióforos septados, simples o ramificados, geniculados o doblados en el ápice, de color marrón claro a oscuro de 39 a 430 μm de largo, los conidios usualmente presentan cuatro celdas, son lisos a asperulados, curvados en la tercera celda de 21 por 13 μm ; hilio no sobresaliente, plano, oscurecido y engrosado (Dimuthu *et al.*, 2012). *In vitro* las colonias son algodonosas y negras oliváceas, en agar harina de maíz alcanzan un diámetro de 7.2 cm en 7 días a 27 °C (García Aroca, 2018).

Los géneros de *Curlvularia* y *Bipolaris* forman un complejo que provoca enfermedades como mancha foliar, pudrición de la raíz y tizón principalmente en cultivos de la familia Poaceae como maíz, arroz, trigo o sorgo; sin embargo, al ser parásitos no obligados, es decir, al no tener hospedero específico, éstos también pueden incidir en al menos otros 60 géneros de familias como Anacardiaceae, Araceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Rutaceae y Zingiberaceae (Martin, 1971; Dimuthu *et al.*, 2012; Manzar *et al.*, 2022).

La taxonomía de este complejo es confusa ya que frecuentemente se han producido cambios de nomenclatura y refinamientos, inicialmente se modificó la ortografía de "*Helmisporium*" a *Helminthosporium* (Link, 1809), al diferir los *Hyphomycetes* (nombre de clase antigua de Ascomyta) originalmente agregados *Helminthosporium* por originar conidios de forma solitaria en el ápice de los conidióforos y posteriormente alargarse subapicalmente. Nisikado (1928, 1929) los segregó a dos subgéneros, *Cylindro-Helminthosporium* que presenta conidios rectos, cilíndricos y germinan por uno o más tubos germinativos de cualquier célula conidiogena y *Eu-Helminthosporium*, subgénero con conidios frecuentemente curvos, fusiformes, los cuales germinan solo por células terminales. Posteriormente, Ito (1930) elevó *Cylindro-Helminthosporium* a la

categoría *Drechslera*. Tras distintas modificaciones, finalmente Shoemaker (1959) propuso que el nombre *Drechslera* se restringiera a especies con conidios cilíndricos que germinan de cualquier célula y erigió un nuevo género denominado “*Bipolaris*”. Así *graminicolous Helminthosporium* fue segregado en varios géneros incluyendo *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* y *Exserohilum*, géneros pertenecientes a Ascomycota, Dothideomycetes, Pleosporales, Pleosporaceae (Shoemaker, 1959; Sivanesan, 1987; Manzar *et al.*, 2022).

Es difícil identificar estas especies de manera confiable basándose únicamente en los signos y síntomas observados ya que son similares, se asocian con manchas marrones, grises o negras en las hojas, tizones, necrosis, amarillamientos, pudriciones, entre otros, encontrándose frecuentemente en hojas, tallos y raíces de diferentes cultivos (Piontelli, 2015). Tanto *Curvularia* como *Bipolaris* tienen sus estados sexuales ubicados en phylum Ascomycota y género *Cochliobolus*, incluso algunas especies de *Bipolaris*, al igual que *Curvularia*, tienen conidios curvos con células apicales hialinas, una ligera diferencia de distinción es que en *Curvularia* suelen tener sólo dos o tres células centrales oscuras y una de ellas está excesivamente agrandada a diferencia *Bipolaris* que suele presentar curvatura continua a lo largo del conidio (Dimuthu *et al.*, 2012; Manzar *et al.*, 2022).

El manejo agronómico y fitosanitario para dicho complejo en control cultural sugiere el uso de semillas certificadas, variedades resistentes, sembrar en áreas donde no se ha reportado el patógeno, eliminar y quemar plantas enfermas, residuos vegetales o rastrojos de las mismas, además de evitar usar semillas, hijuelos o partes vegetativas de la planta enferma. En control biológico el uso de aceites y extractos naturales de *Symphytum officinale*, *Lantana cámara*, *Piper aurantium*, *Citrus sinensis* u hongos como *Trichoderma viride* o *T. harzianum* reportan haber reducido hasta el 70% de las enfermedades causadas por *Curvularia* o *Bipolaris* (Abdel-Fattah *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2014; SENASICA, 2018). En control químico la aplicación de fungicidas como difenoconazol, propiconazol o trifloxystrobin se pueden aplicar como tratamiento preventivo o de control (Otoni *et al.*, 2000; SENASICA, 2021). También se ha reportado el uso *in vitro* de ácido benzoico o calcio como inhibidor (Ahn y Suh, 2007; Shabana *et al.*, 2008; SENASICA, 2021). El uso de nanopartículas de plata en agave no se ha implementado hasta ahora; sin embargo, existe evidencia de la aplicación de AgNPs en otros cultivos como *A. thaliana* y agentes fitopatógenos (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Curvularia sp.*) en los que se ha implementado con resultados favorables de inhibición (Balashanmugam *et al.*, 2016).

3. Planteamiento del problema

Los magueyes o agaves, son plantas endémicas de gran importancia en México (Granados 1993; Illsey *et al.*, 2005), país considerado como centro de origen y diversificación del género (Nobel, 1988; García-Mendoza, 2007; García-Herrera *et al.*, 2010). En el Estado de Hidalgo, el agave es ampliamente aprovechado debido a sus múltiples servicios agroecológicos y por sus derivados, tal es el caso del pulque, la barbacoa, mixiote, ixtle, entre muchos otros; sin embargo, la producción del mismo se ve afectado por problemas reproductivos de la planta, velocidad de crecimiento de la misma, aunado por el robo de pencas para la preparación de platillos gastronómicos y extracción parcial o total del agave para la obtención de plagas comestibles, factores abióticos e incidencia de plagas y enfermedades.

En la Escuela Superior de Apan (ESAp), perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), ubicada en localidad de Chimalpa Tlalayote, Apan, Hgo., se encuentran ejemplares de *Agave salmiana* (Otto ex Salm-Dyck) los cuales presentan una enfermedad conocida comúnmente como “negrilla”, se desconoce el agente causal de dicha enfermedad; sin embargo, se cree que puede ser ocasionada por el hongo *Asterina mexicana* reportado por Ellis y Everhart (1900). Esta enfermedad ocasiona que las hojas tengan manchas de tonalidades negras en ambas caras de la penca y en casos severos puede resultar en pencas raquílicas que pueden llegar a secarse (Díaz-Martínez, 2019). Para la identificación del patógeno comúnmente se utilizan distintas metodologías que permiten la identificación morfológica, morfométrica, molecular y filogenética, con la finalidad de conocer la reproducción, características estructurales que permitan controlar, inhibir o erradicar el crecimiento del agente fitopatógeno en el agave. Los métodos de control de plagas fitopatógenas, más comúnmente utilizadas son el control mecánico, biológico y químico, siendo el último el mayormente implementado, consecuentemente puede afectar de manera significativa a la microbiota del suelo, el medio ambiente e incluso a la salud tanto del aplicador sino se lleva el atuendo adecuado para protección del mismo, o inclusive puede repercutir en la salud de los consumidores (Rodríguez *et al.*, 2017; Jiménez-Quintero *et al.*, 2016).

La búsqueda de nuevas técnicas ha llevado a considerar la aplicación de nanopartículas de plata debido a las propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antivirales que se han reportado (Gupta *et al.*, 2018).

4. Justificación

El *Agave salmiana* se distribuye principalmente en el valle de México, en los Estados de México, Puebla, Tlaxcala e Hidalgo, siendo éste último de gran importancia no solo por el aprovechamiento que se la da, sino también por el uso del mismo que podría recuperar la erosión reportada del 68% del Altiplano Central Mexicano (Moncada *et al.*, 2013; Narváez *et al.*, 2020).

Hidalgo está ubicado parcialmente en la Cuenca de México y la región montañosa de la Cordillera Neo-Volcánica, agrupa a sus 84 municipios en diez regiones geográfico-culturales, una de ellas es la Altiplanicie pulquera, misma que está conformada por los municipios de Apan, Almoloya, Emiliano Zapata, Tepeapulco, Tlanalapa, Zempoala, Epazoyucan y Singuilucan (Roldán 2015; Roldán, 2017; Narváez *et al.*, 2020).

Hidalgo es el principal productor de aguamiel. En 2016 el estado produjo 194,579 toneladas, mientras que, en 2017 fueron 217,700 toneladas, aportando el 69.6% de la producción nacional de aguamiel (SAGARPA, 2016; SIAP, 2018; Ramírez-Manzano *et al.*, 2020).

Actualmente la FAO ha incluido a *A. salmiana* en la lista de especies en peligro de extinción (Gaceta del Senado, 2017). Entre las causas que intervienen en este estatus se encuentra la incidencia de plagas y enfermedades, siendo el picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*) la plaga que mayoritariamente afecta en todas las etapas fenológicas del cultivo, ocasionando pérdidas de hasta un 80%. En cuanto a enfermedades, la mancha gris o tizón foliar (*Cercospora agavicola*), marchitez del agave (*Fusarium oxysporum*) y pudrición de cogollo (*Pectobacterium carotovorum*) disminuyen el vigor de la planta, ocasionando en casos severos la muerte de la misma (CESAVEP, 2017).

En el estado de Hidalgo se ha observado la presencia de negrilla en *A. salmiana*, la incidencia de esta enfermedad no cuenta con datos estadísticos acerca de las pérdidas en la producción o rendimiento del cultivo, por lo anterior la presente investigación es uno de los pioneros en el campo de la fitopatología que pretende no sólo la identificación del agente patogénico; si no además, proponer una forma de control que disminuya la incidencia y severidad de la enfermedad.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de las nanopartículas de plata (AgNPs) sobre el fipatogeno causante de la negrilla en *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck.

5.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) por medio del método coloidal.
- Caracterizar estructuralmente las nanopartículas de plata (AgNPs) a través de la microscopía electrónica de barrido (*SEM*).
- Caracterizar las propiedades ópticas las nanopartículas de plata (AgNPs) a través de la espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis).
- Evaluar el efecto de las nanopartículas de plata (AgNPs) sobre el agente fitopatológico causante de la enfermedad negrilla en condiciones *in vitro*.
- Evaluar el efecto de las nanopartículas de plata (AgNPs) sobre la sintomatología y severidad de especímenes de *A. salmiana* infectados con el hongo fitopatológico causante de la enfermedad negrilla.

6. Hipótesis

Las nanopartículas de plata (AgNPs) poseen actividades antifúngicas, por lo que si se emplean asperjadas en hijuelos de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck inoculados con el agente causal de la negrilla entonces se inhibirá el crecimiento del patógeno.

7. Materiales y métodos

7.1. Descripción del área de estudio

El sitio experimental del presente trabajo se desarrolló en la Escuela Superior de Apan ubicada en la localidad de Chimalpa Tlalayote, perteneciente al municipio de Apan y en el Laboratorio de Fitopatología y Plagas del Instituto de Ciencias Agropecuarias ubicado en Tulancingo de Bravo, ambas escuelas pertenecientes a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

7.2. Obtención del material biológico vegetal

7.2.1. Selección y manejo de hijuelos de *A. salmiana* a partir de características fenológicas

Se seleccionaron 96 hijuelos sanos de 25 a 30 cm de altura de plantas madre de *A. salmiana* ubicadas dentro de las instalaciones de la Escuela Superior de Apan (ESAp-UAEH). Para la preparación del sustrato consistió en una mezcla de tezontle y estiércol con suelo del área, en proporción 2:2:7. El sustrato final obtenido se colocó dentro de bolsas de 30 x 30 cm. En cuanto a la planta, se retiraron las púas del ápice presentes en las hojas para facilitar el manejo y evitar daños durante la manipulación de los hijuelos. Una vez que el sustrato fue distribuido en bolsas y regado a capacidad de campo, se trasplantaron los hijuelos de *A. salmiana* en ellas.

7.3. Obtención y caracterización del material microbiológico

7.3.1. Aislamiento del agente patogénico extraído de lesiones foliares en *A. salmiana*

Los individuos de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck ubicados en las instalaciones de la (ESAp-UAEH), actualmente presentan signos y síntomas de la enfermedad comúnmente conocida como “negrilla”. Profesores investigadores integrantes del cuerpo académico de Biociencias moleculares de la ESAp-UAEH, aislaron hongos a partir de las manchas foliares negras presentes en *A. salmiana* para su posterior evaluación. De las cepas aisladas, varias se donaron para la realización del presente trabajo.

7.3.2. Crecimiento y conservación del hongo

En el laboratorio de Fitopatología y Plagas del ICAp, se preparó medio PDA, de acuerdo con las instrucciones del proveedor, para la preservación y estudio del hongo. El inóculo provenía de muestras micelares de 4 mm de diámetro que eran incubadas a 28 °C en condiciones de oscuridad. |

7.3.3. Identificación y caracterización del agente causal de negrilla en *A. salmiana*

Para la identificación y caracterización del hongo aislado de lesiones con síntomas de “negrilla” en *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck, se colaboró con el Laboratorio de Micología de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) perteneciente al Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) ubicado en el municipio de Tecámac, Estado de México.

Se seleccionaron cajas Petri con crecimiento del hongo y en colaboración con el Laboratorio de Micología, se realizó la descripción morfométrica para determinar el género y especie del hongo con corroboración de la técnica molecular, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction y análisis filogenético de secuencias genómicas de ADN.

7.3.3.1. Identificación morfométrica

Para corroborar la identificación del hongo fitopatógeno causante de la negrilla en *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck con los trabajos realizados por profesores investigadores integrantes del cuerpo académico de Biociencias moleculares de la ESAp-UAEH, se observaron y midieron las estructuras diferenciales que permitieran asociar a los especímenes con los grupos taxonómicos de posibles agentes, para dicho procedimiento se utilizaron las claves taxonómicas de “Dematiaceous Hyphomycetes” de Martin, (1971) y “The genus *Bipolaris*” de Dimuthu *et al.*, (2014).

Se realizaron laminillas permanentes, temporales y muestras en cámara húmeda, mismas que se llevaron al microscopio óptico Primostar 3 ZEISS con cámara integrada Axiocam 208 color, que junto con el programa ZEN 3.6 (blue edition) se midió, cuantificó y observó el color y morfología de la colonia, tipo de micelio, presencia o ausencia de esporas, tamaño, forma, color de conidios y conidióforos; en caso de los conidios, además de las características anteriormente mencionadas, se midió el largo del hilum así como la cantidad de pseudoseptos, mientras que en los conidióforos se cuantificó el largo, ancho y la cantidad de conidios.

Para la colección del Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF-MIC) perteneciente a SENASICA, se incorporaron las laminillas permanentes y cajas Petri con cepa del agente causal de negrilla en *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck para su preservación como hongo de importancia económica para México.

7.3.3.2. Técnica molecular: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El diagnóstico molecular comprendió la amplificación de regiones específicas, secuenciación de ellas y filogenia molecular. Es una técnica utilizada para amplificar u obtener varias copias de una región particular de ADN. Para la identificación del agente causal de negrilla en *A. salmiana* se utilizó el método de extracción de ADN propuesto por Doyle and Doyle (1987) “A rapid ADN isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue”, seguida de una amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction, así como la subsecuente secuenciación tipo Sanger y la reconstrucción filogenética con secuencias de referencia.

Extracción de ADN genómico

El primer paso de la extracción de ADN es producir lisis celular o rompimiento de la membrana para liberar los componentes celulares (ADN). Para ello, se maceró hasta 0.1 g de micelio en mortero con presencia de nitrógeno líquido hasta obtener polvo micelar que se depositó en tubos de microcentrífuga de 2 mL, se agregó 1 mL de buffer de Extracción CTAB previamente calentado a 65 °C y 0.05 g de Polivinilpirrolidona (PVP), se mezcló por inversión y se incubó a 65 °C durante 1

h en termobloque. Consecutivamente se dejó enfriar por 10 min a temperatura ambiente, se adicionó 500 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó por inversión durante 10 min. Una vez finalizado el proceso se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min para formar una interfase, de la cual se recuperó la fase superior acuosa y se depositó en un tubo nuevo y estéril de 1.5 mL. Para precipitar el ADN, se adicionó 750 µL de isopropanol frío, se invirtió y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Después de ello se centrifugó a 12,000 rpm, durante 10 min, al final de dicho proceso se obtuvo la pastilla de ADN, se decantó el isopropanol por inversión cuidando de no perder la pastilla, para el lavado de la misma se adicionó 500 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min (en este paso se repite nuevamente el lavado con etanol al 70% y centrifugar a 12,000 rpm durante 2 min). Se secó la pastilla y se resuspendió el ADN en 50 mL de agua grado molecular, la concentración y pureza se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000/2000c Thermo Scientific), (Doyle and Doyle, 1987).

Espectrofotometría

Para determinar el grado de pureza y concentración de la muestra de ADN, se ocupó un espectrofotómetro NanoDrop 2000/2000c Thermo Scientific. Inicialmente se limpió el lente óptico (pedestal), se colocó 1 µL de agua grado biología molecular como control blanco o referencia, posteriormente se colocaron las muestras obtenidas de la extracción de ácidos nucleicos para obtener concentración en ng/µL, así como las gráficas de absorbancia. La longitud de onda de 260 nm se utiliza para calcular el valor de la concentración de ADN, la relación 260/280 nm indica un ADN de pureza óptima, el cual tiene un valor ideal entre 1.8-2.0, la relación > 1.6 indica una pureza aceptable, mientras que a < 1.6 indica una posible contaminación. En valores de 230 nm absorbe contaminantes como sales, fenoles o carbohidratos, la relación 260/230 con valores de 2.0-2.2. Indica un ADN puro, menor a 1.8 indica contaminación y menor a 1.5 indica impurezas en la muestra (Banco Nacional de ADN Carlos III, 2020).

Amplificación

Para llevar a cabo la síntesis exponencial o amplificación de una región determinada de ADN de la muestra se realizó PCR con base en el kit Platinum™ *Taq* ADN Polymerase de Invitrogen, se preparó la mezcla de reacción PCR “Master mix” (Tabla 5), en cuanto a los oligonucleótidos forward y reverse, también llamados primers o cebadores se describen en la Tabla 6.

Tabla 5. Componentes para la preparación de mezcla PCR master mix con base en el kit Platinum™ *Taq* ADN Polymerase de Invitrogen

	1x	16X
Agua libre de nucleasas	17.4 µL	278.4 µL
10X PCR Buffer (-Mg)	2.5 µL	40 µL
50 mM MgCl ₂	0.75 µL	12 µL
10 mM dNTP mix	0.5 µL	8 µL
10 µM forward primer	0.5 µL	8 µL
10 µM forward reverse	0.5 µL	8 µL
KB Extender	0.75 µL	12 µL
Platinum™ <i>Taq</i> ADN Polymerase	0.1 µL	1.6 µL

Tabla 6. Oligonucleótidos

Marcador Molecular	Nombre completo	Oligonucleótido	Dirección	Secuencia (5'-3')	Amplicon (pb)
ITS	Internal Transcribed Spacer	ITS-1	Forward	TCCGTAGGTGA ACCTGCGG	650
		ITS-4	Reverse	TCCTCCGCTTAT TGATATGC	

Una vez que se obtuvo la mezcla “Master Mix”, en la cabina ADN/RNA UV cleaner box UVC/T-M-AR se adicionó la suspensión en mismo volumen (23 µL) a 16 tubos para PCR (0.2 mL), de los cuales a 8 se les agregó 2 µL de ADN genómico de la muestra de interés a 25 ng/µL, 4 controles positivos (2 con *Fusarium solani* y 2 con *Phytophthora capsici*) y 4 controles negativos con agua grado biología molecular. Posteriormente se llevaron los tubos al termociclador BIO-RAD T100™ Thermal Cycler.

En dicho termociclador el proceso para la amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C para permitir la separación de la doble cadena del ADN, posteriormente 35 ciclos de amplificación que incluyen 45 s a 95 °C, 45 s a 58 °C para permitir la hibridación de los oligonucleótidos y 45 s a 72 °C, concluyendo con una extensión final a 72 °C, de esta manera se obtuvieron varias copias de la región de ADN específica del marcador molecular ITS. Al terminar el proceso cíclico con duración total de 1 hora con 51 minutos, obtenemos una amplificación final con millones de copias del ADN (Fig. 12).

Electroforesis

Después de la PCR, el producto fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 2%, en el cual se produce una migración de moléculas que viajan a través de un material poroso, en donde los ácidos nucleicos por poseer carga negativa (grupo fosfato) migran al polo positivo al generar un campo magnético. De este modo se obtiene información sobre la cantidad y calidad del ADN genómico extraído, así como de los productos obtenidos en la PCR (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Para la preparación de gel de agarosa al 2% se pesaron 2 g de agarosa diluidos en 100 mL de Buffer TAE 1X, esta solución se calentó en horno de microondas cercano al punto de ebullición y posteriormente se adicionó 3 µL del reactivo de tinción Gel RED 10,000 X, finalmente se vertió en el portageles, una vez solidificado se introdujo en la cámara de electroforesis y se le añadió Buffer TAE 1X hasta cubrir el gel. Secuencialmente en un parafilm se colocó 3 µL de Buffer de carga azul (10X Blue Juice Gel Loading de Invitrogen), por cada muestra se adicionó 7 µL del producto de PCR por cada única gota y se cargó en el pozo de gel correspondiente, además del marcador molecular (100 pb MM Track It de Invitrogen). Al finalizar de cargar todas las muestras se programó la fuente de poder a 80 Volts por 1 hora con 30 min, obteniendo productos con peso similar al estimado. Consecutivamente el gel se depositó en la charola de electroforesis, para su posterior análisis en el fotodocumentador Biorad.

Secuenciación

Para la secuenciación tipo Sanger, los productos de PCR amplificados de 650 pb se secuenciaron en ambos sentidos con el equipo ABI PRISM 3130 de Applied Biosystems® mediante la química BigDye™ Terminator v3.1. en el Laboratorio de Biología Molecular del CNRF.

7.3.3.3 Análisis filogenético de secuencias genómicas de ADN

Mediante el análisis filogenético se puede lograr estimar una relación de parentesco con la reconstrucción de un árbol filogenético que muestra la historia evolutiva del grupo taxonómico de estudio, mediante una comparación de la secuencia nucleotídica obtenida con otras secuencias depositadas previamente en bancos públicos de genes (Gallou *et al.*, 2015).

Inicialmente en el Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés National Center for Biotechnology Information) se corroboró el agente de interés a nivel género. Secuencialmente se utilizó el programa informático “Herramienta básica de búsqueda de alineación local – NCBI” (BLAST) (White *et al.*, 1990).

Posteriormente en “GenBank”, la base de datos de secuencias genéticas de Institutos Nacionales de Salud (NIH, por sus siglas en inglés National Institutes of Health) se seleccionaron todas las secuencias reportadas en NCBI de BLAST, así como por Dimuthu *et al.*, 2014 y Marin-Felix *et al.*, 2017 pertenecientes al género del agente causal de negrilla previamente identificado.

Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el programa “Molecular Evolutionary Genetics Analysis (mega)”, el modelo de sustitución nucleotídica fue “T92+G-Tamura 3 parameter” con distribución gamma y la reconstrucción filogenética se realizó con el algoritmo “InL Construct/Test Maximun Likelihood Tree”.

7.4. Síntesis de nanopartículas de plata

Para la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) se realizó un arreglo que consistió de una parrilla de calentamiento que posee un regulador para controlar la velocidad de agitación y la temperatura del matraz bola (reactor); en un extremo se suspende un termómetro que mide la temperatura alcanzada en el sistema de reacción y en el otro de sus extremos se acopla una jeringa para inyectar la solución reactante (en la parte central lleva acoplado un sistema refrigerante para el proceso de reflujo).

Se utilizó citrato de sodio como agente reductor y estabilizador al mismo tiempo. Para preparar las nanopartículas monometálicas de plata, se utilizó la técnica química coloidal. Se prepararon soluciones nitrato de plata (0.033 mmol de AgNO₃ en 25 mL de agua).

Para la preparación de las AgNPs, 50 mL de la solución de nitrato de plata fue puesta a reflujo a 100 °C y en agitación, 5 mL de solución acuosa al 1% de citrato de sodio fue adicionada y puesta a reflujo por 2 h. Después de la introducción de la solución de citrato, se observó el color amarillo característico de dispersiones coloidales metálicas de Ag de tamaño nanométrico, antes de dicho cambio, hubo un periodo de inducción o de espera de aproximadamente 40 min., debido a la

formación del precursor. Al finalizar las 2 h, se obtuvieron dispersiones de coloidales estables en concentraciones de 80, 100 y 150 ppm.

7.4.1. Caracterización morfológica y estructural de las nanopartículas de plata (AgNPs)

Los coloides de nanopartículas de plata en agua desionizada como solvente, estas soluciones con concentraciones de 80, 100 y 150 ppm, se caracterizaron ópticamente en el espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific Serie GENESYS 10S, posteriormente se sometieron a un análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (*SEM*) para obtener la información referente a su forma, tamaño, cristalinidad y composición; en un equipo JEOL IT-300, que está equipado con Espectroscopia de rayos X dispersados (EDS).

Las soluciones coloidales de nanopartículas de plata (AgNPs) se sonicaron durante 10 min para evitar que las partículas se aglomerasen, posteriormente se tomó una muestra de cada concentración, estas se depositaron sobre cintas de carbono, y posteriormente en el portaobjetos, finalmente se dejaron secar. De manera general, el funcionamiento del Microscopio Electrónico de Barrido, es el siguiente, en el filamento de tungsteno se obtiene un voltaje de aceleración que opera desde 0.3 hasta 30 kV, que envía electrones que pasan por bobinas electromagnéticas (lentes), las lentes dirigen el haz de electrones a la muestra y la interacción con los electrones, genera un estado de excitación, el cual libera energía, que es identificada por los detectores de electrones retrodispersados y secundarios, estas señales son las que darán lugar a la formación de la imagen.

7.5. Evaluación del efecto de las nanopartículas de plata (AgNPs) en el crecimiento *in vitro* del hongo

Para la evaluación del efecto de las nanopartículas de plata, se adicionó AgNPs al PDA, a concentraciones de 0, 10, 30 y 45 ppm, posteriormente se colocaron discos de 4 mm de diámetro micelar.

Durante el periodo evaluación con ayuda de un vernier digital se midió al primer, segundo, tercer, cuarto y quinto día el crecimiento radial, para obtener la velocidad de crecimiento radial de acuerdo con la ecuación 1:

$$\text{Velocidad de crecimiento} = \frac{\text{crecimiento radial (mm)}}{h} \quad (1)$$

En cuanto al porcentaje de inhibición se calculó mediante la ecuación 2:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{crecimiento radial con AgNPs}}{\text{crecimiento radial del control}} * 100 \quad (2)$$

7.6. Evaluación del efecto de AgNPs en el crecimiento *in vivo* del agente causal de la negrilla inoculado en hojas de *A. salmiana*.

7.6.1. Obtención de suspensión de conidios

En condiciones estériles y de asepsia, se raspó el medio PDA con crecimiento de micelio de cajas Petri, se maceró hasta la obtención de una pasta homogénea la cual fue filtrada con ayuda de una solución de Tween al 20%. Se realizó un segundo filtrado y se transfirió a tubos falcón para su centrifugación a 18 °C con una velocidad de 5,000 rpm durante 15 min, rescatando el pellet que contenía los conidios.

7.6.2. Cuantificación de conidios

Para la cuantificación de los conidios se realizó una suspensión en una relación 1:10 y se colocó 10 µL de la suspensión sobre una cámara de Neubauer. La cámara se llevó a microscopio, y con ayuda de un contador de células se contaron los conidios en 5 cuadrantes. Para el cálculo de la concentración se aplicó la ecuación 3:

$$\text{Concentración (conidios/mL)} = \frac{\text{número de conidios} \times 10,000}{\text{número de cuadros} \times \text{dilución}} \quad (3)$$

Dónde el número de conidios es la suma de todos los contabilizados en cada cuadro seleccionado de la cámara de Neubauer, y el valor 10,000 una constante que deriva de las propiedades volumétricas de la cámara.

7.6.3. Preparación del inóculo

En condiciones asépticas se diluyó la suspensión de conidios hasta alcanzar una concentración final de 1×10^5 conidios/mL.

7.6.4. Inoculación por aspersión del agente causal de negrilla en tejido vegetal de *A. salmiana*.

Se seleccionaron 96 magueyes visualmente sanos, posteriormente se dividieron en 12 grupos, conformados por ocho hijuelos de *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck, mismos a los que se les realizaron tres heridas foliares de 4 mm de diámetro.

Para evaluar un posible efecto toxicológico de las AgNPs, las heridas foliares fueron asperjadas con 0, 80, 100 y 150 ppm del compuesto químico (grupos 1, 2, 3 y 4, respectivamente). Dichos grupos recibieron tres aplicaciones con tres repeticiones (Figura 8a).

Para evaluar si la aplicación de AgNPs podría tener efecto preventivo sobre la incidencia y severidad de la negrilla en agave, se aplicaron éstas a diferentes concentraciones (0, 80, 100 y 150 ppm) sobre las heridas foliares 14 días antes de la inoculación con el agente fúngico (grupos 5, 6, 7 y 8, respectivamente). Dichos grupos recibieron tres aplicaciones de AgNPs con tres repeticiones por herida al día -14, -7 y 0 (Figura 8b).

Por último, para evaluar un efecto correctivo de la enfermedad, se aplicaron AgNPs en concentraciones de 0, 80, 100 y 150 ppm sobre las heridas foliares (grupos 9, 10, 11 y 12, respectivamente) 14 días después de la inoculación. Dichos grupos recibieron tres aplicaciones de AgNPs con tres repeticiones al día 0, +7 y +14 (Figura 8c).

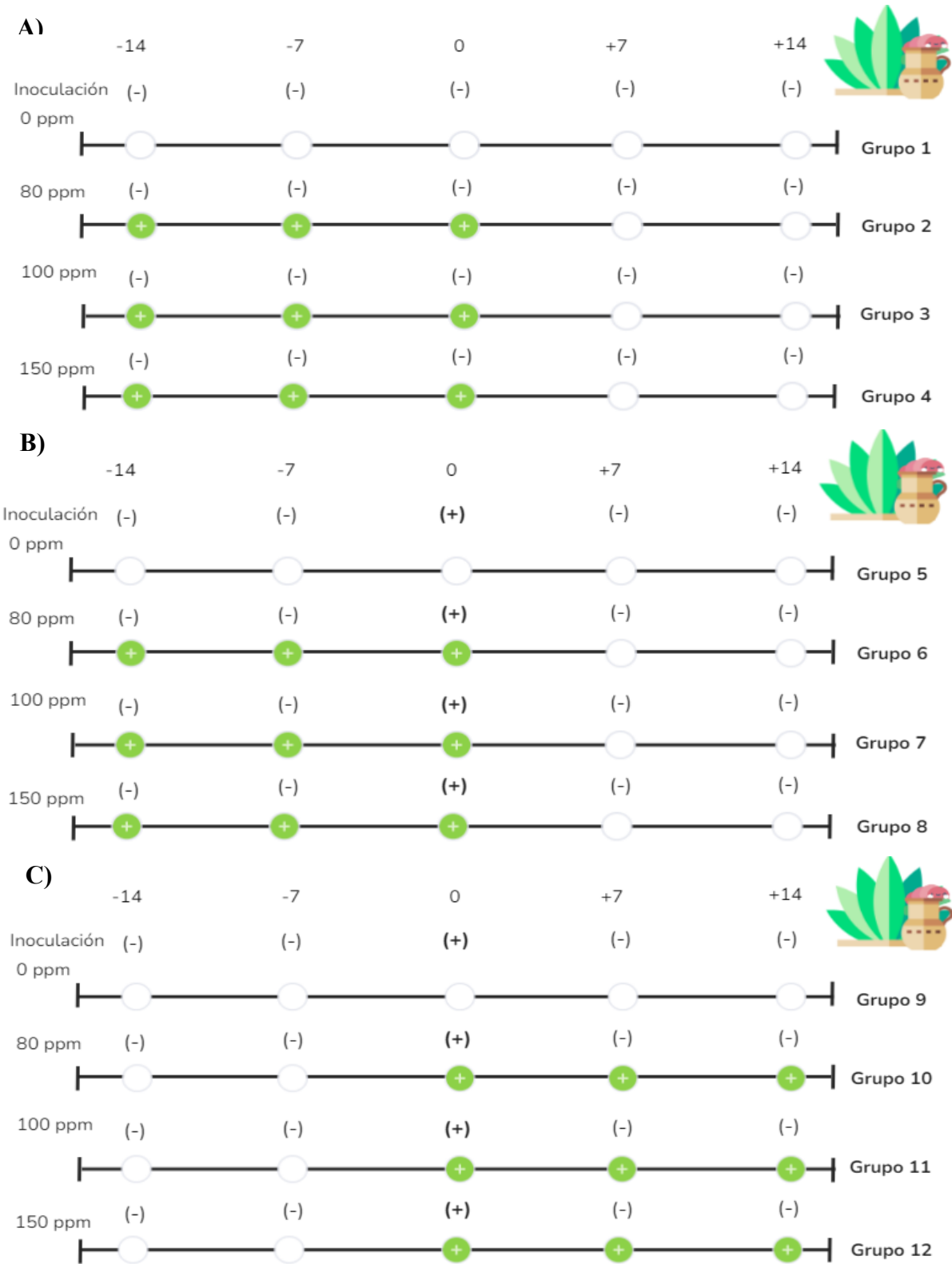


Figura 8. Efecto de las nanopartículas de plata (AgNPs) a diferente concentración asperjadas pre y post inoculación del agente patógeno a diferentes grupos constituidos por ocho hijuelos de *A. salmiana*.

(A) Aplicación de AgNPs a diferentes concentraciones (Grupos 1-4) sobre hojas de agave para evaluar el posible efecto toxicológico de las nanopartículas. (B) Aplicación de AgNPs a diferentes concentraciones (Grupos 5-8) sobre hojas de agave a los -14, -7 y 0 días antes de la inoculación con el agente infeccioso (tratamiento preventivo). (C) Aplicación de AgNPs a diferentes concentraciones (Grupos 9-12) sobre hojas de agave a los 0, 7 y 14 días post inoculación (tratamiento correctivo). Cada grupo se conformó aleatoriamente con ocho hijuelos de *A. salmiana*

Figura: Autoría propia.

Evaluación de sintomatología

Se realizaron 3 evaluaciones de los síntomas y signos presentados a los 15, 28 y 70 días post inoculación para cada tratamiento. Para determinar el porcentaje de incidencia de la enfermedad se calculó mediante la ecuación número 4:

$$I = \frac{\text{Número de plantas enfermas}}{\text{Total de plantas evaluadas}} * 100 \quad (4)$$

Para la evaluación de severidad de cada tratamiento se propuso la creación de una tabla utilizando 5 categorías respecto al porcentaje de follaje afectado (Tabla 7, Fig. 9).

Tabla 7. Categorías de severidad para la evaluación de daños producidos por el agente causal de negrilla en *Agave salmiana*

Grado de severidad	Descripción
0	0% de follaje afectado: Planta visualmente sana.
1	1 al 20% de follaje afectado: Hojas basales con amarillamiento y/o necrosis apical, manchas verde o amarillo claro a oscuras, ovoides o redondas
2	21 al 40% de follaje afectado: Hojas basales amarillas con necrosis, hojas medias con manchas verde o amarillo claro a oscuras, ovoides o redondas con un halo clorótico, distribuidas uniformemente sobre el área foliar.
3	41 al 60% de follaje afectado: Hojas con necrosis, manchas amarillas o marrones a negras, distribuidas uniformemente sobre el área foliar.
4	61 al 80% de follaje afectado: Hojas con manchas grisáceas a negras en ambas caras de la penca distribuidas uniformemente sobre el área foliar.
5	81 al 100% de follaje afectado: Planta totalmente cubierta por manchas negras en el área foliar, hojas medias con clorosis o necrosis y hojas basales completamente secas.

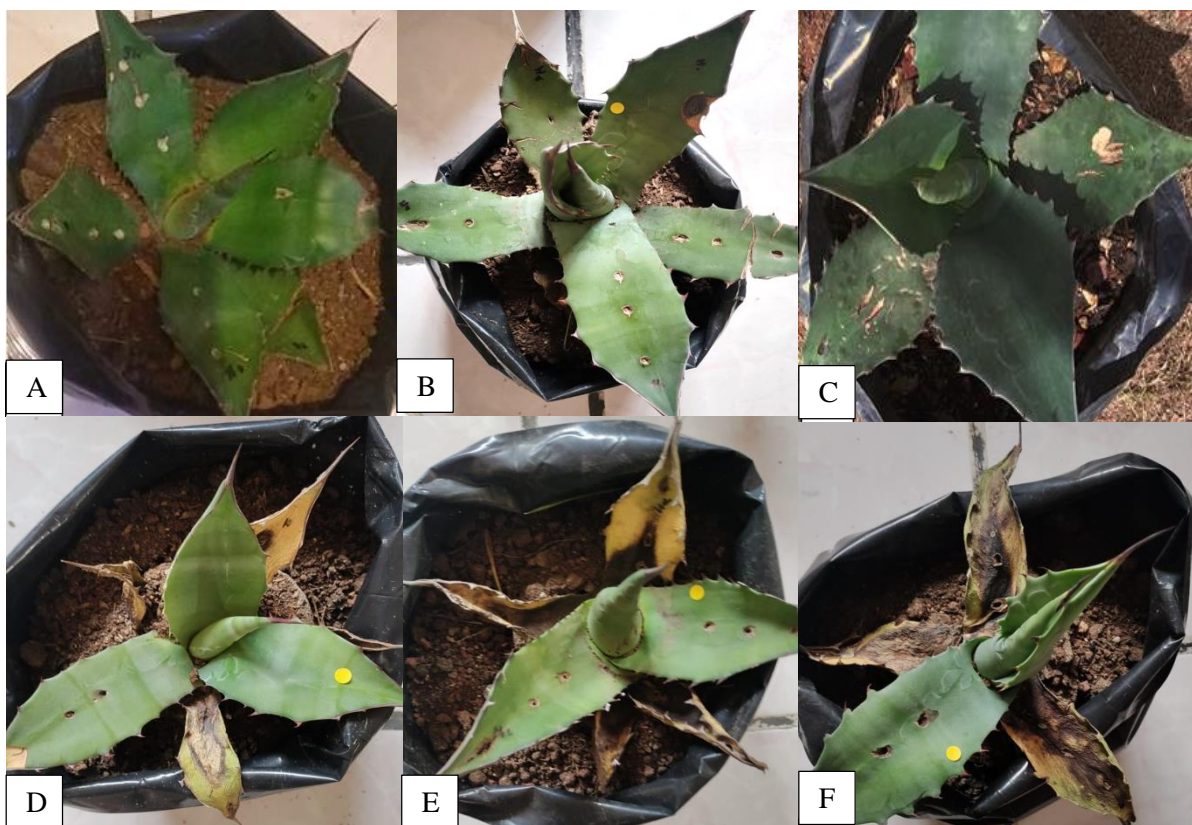


Figura 9. Categorías de severidad.

(A) Grado 0, con 0% de follaje afectado, B) Grado 1, con 1 al 20% de follaje afectado, C) Grado 2, con 21 al 40% de follaje afectado D) Grado 3, con 41 al 60% de follaje afectado, E) Grado 4, con 61 al 80% de follaje afectado y F) Grado 5, con 81 al 100% de follaje afectado.

Figura: Autoría propia.

Posteriormente para la evaluación de severidad por categoría se calculó mediante la ecuación número 5:

$$S = \frac{\text{Número de plantas enfermas por categoría}}{\text{Total de plantas evaluadas}} * 100 \quad (5)$$

7.7. Análisis estadísticos

Para los diseños experimentales, se realizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) a un nivel de significancia de 5 % ($P \leq 0.05$). Posteriormente para comprobar si el análisis de varianza fue significativo, se realizó la prueba de Tukey de comparación múltiple de las medias con el mismo nivel de significancia en el programa de Minitab 18.

8. Resultados

8.1. Evaluación de condiciones óptimas de crecimiento *in vitro* del agente causal de la negrilla

Con la finalidad de evaluar las condiciones óptimas de crecimiento de las cepas, se probaron dos valores de pH: 4 (Fig. 10) y 5 (Fig.11) en el medio de crecimiento, en condiciones de oscuridad y temperaturas de 28 °C. Para cuantificar el crecimiento de las cepas en cada pH analizado, se midió el crecimiento radial de las colonias durante los primeros 5 días de incubación y se calculó la velocidad de crecimiento de acuerdo con la ecuación 1.

Como se observa en la Figura 10A, el micelio de las tres cepas se tornó negro-grisáceo a los 30 días y su crecimiento se vio tipo abultado. La velocidad del crecimiento de las cepas bajo pH 4 no varió significativamente (Fig. 10B) en el periodo evaluado, indicando que el pH no afecta la velocidad de crecimiento para alguna de las cepas.

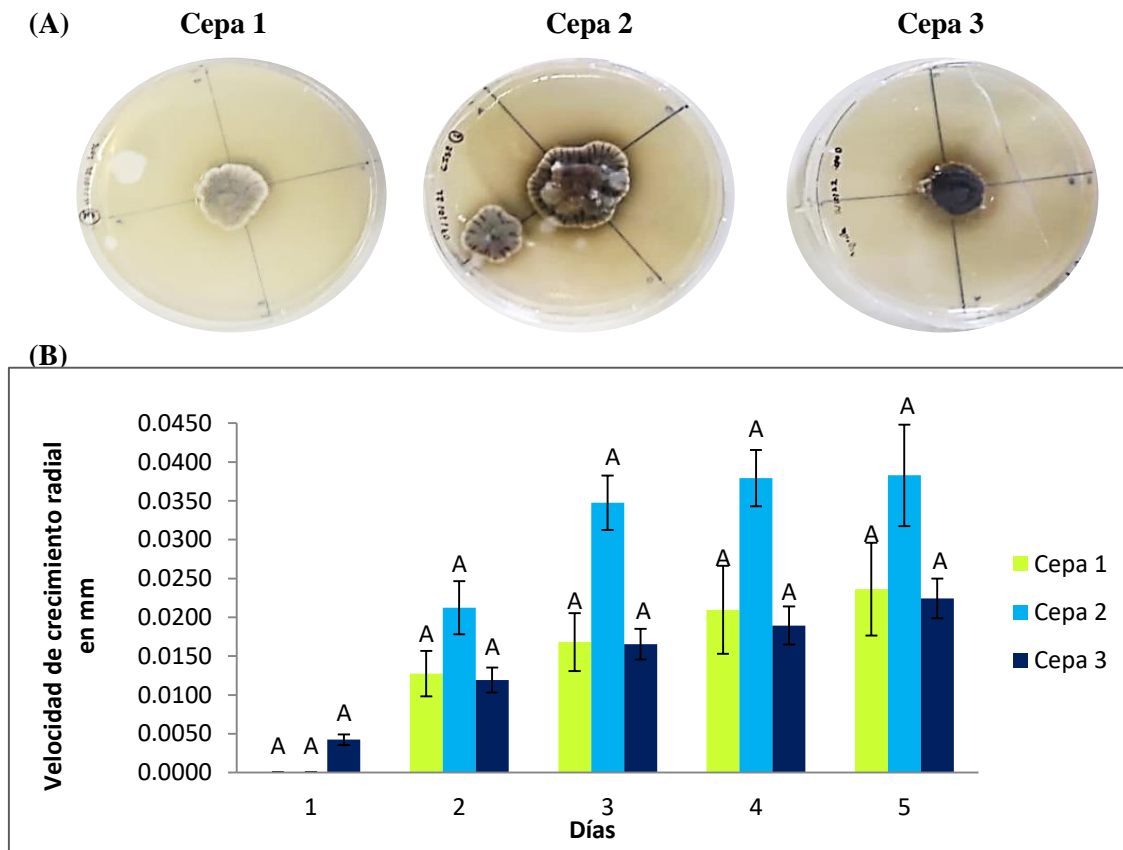


Figura 10. Efecto del pH 4 del medio de cultivo en el crecimiento de tres diferentes cepas del agente patológico responsable de la negrilla.

(A) Fotografía representativa del crecimiento de tres diferentes cepas en medio PDA con un pH ajustado de 4 a los 30 días de incubación, (B) Velocidad media del crecimiento radial de las 3 cepas crecidas en medio PDA con un pH de 4 en los tiempos indicados. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa entre las cepas (Tukey, $p < 0.05$).

Respecto al pH 5, las cepas evaluadas a los 30 días mantuvieron el color negro del micelio, característico de dicha enfermedad (Fig. 11A). De las tres cepas evaluadas, la 3 fue la que presentó mayor velocidad de crecimiento y ésta fue diferente estadísticamente a las cepas 1 y 2 (Fig. 11B). De acuerdo con estos resultados, se eligió la cepa 3 y un pH de 5 para los experimentos subsecuentes.

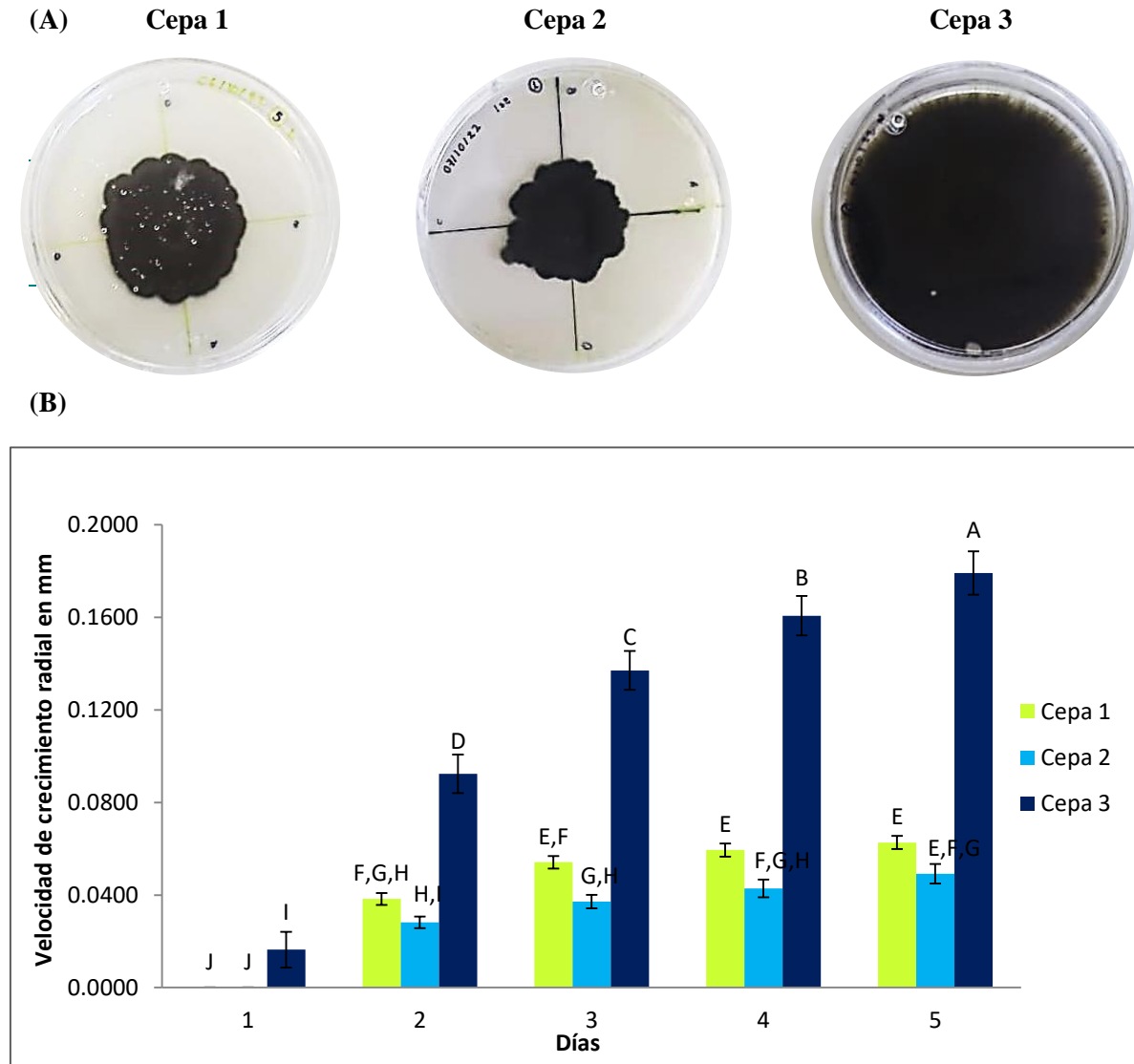


Figura 11. Efecto del pH 5 del medio de cultivo en el crecimiento de tres diferentes cepas del agente patológico responsable de la negrilla.

(A) Fotografía representativa del crecimiento de tres diferentes cepas en medio PDA con un pH ajustado de 5 a los 30 días de incubación, (B) Velocidad media del crecimiento radial de las 3 cepas crecidas en medio PDA con un pH de 5 en los tiempos indicados. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa entre las cepas (Tukey, $p < 0.05$).

8.2. Identificación y caracterización del agente causal de negrilla en *A. salmiana*

8.2.1. Identificación morfométrica

Morfología macroscópica

Las colonias en PDA regularmente alcanzan 10 mm de diámetro en 1 semana, con micelio aéreo escaso a moderado que da una apariencia ligeramente algodonosa o tipo costra, presenta tonalidades blancas o grises en juventud, al madurar éstas se tornan negras en superficie y en el reverso gris oscuro o negro (Fig. 12).

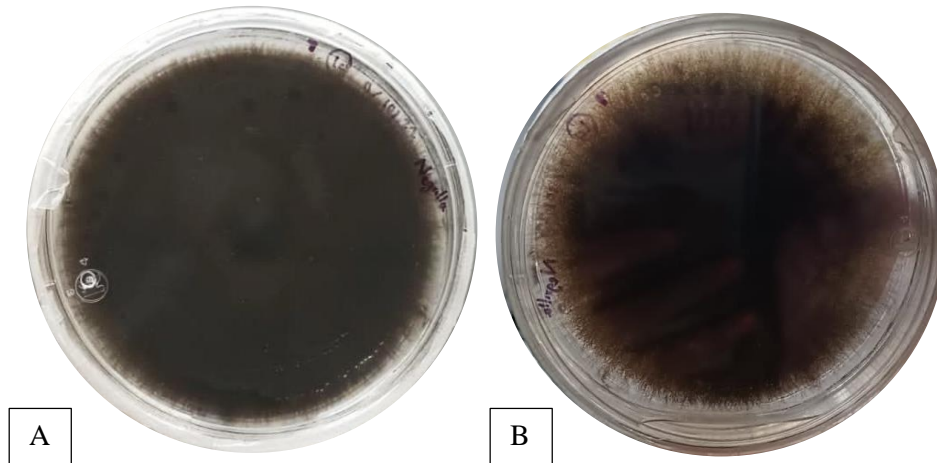


Figura 12. Crecimiento del patógeno causante de negrilla a los 30 días en medio PDA.
(A) Anverso y (B) reverso de la colonia.

Morfología microscópica

Conidióforos ($60-140 \times 4-8 \mu\text{m}$) solitarios o en pequeños grupos ramificados, rectos o ligeramente curvos, con tonalidades hialinas a café marrón, grises oscuros o negros oliváceos. Conidios con 3-8 pseudoseptos (promedio 8), 30-80 (promedio 50) de largo y 12-20 (promedio 15) μm de ancho, lisos, rectos o ligeramente curvados, de tonalidades hialinas cuando están inmaduros, cuando maduran se tornan de café marrón u oliváceo a grises oscuros. Hilum inconspicuo a ligeramente oscuro de 3-10 μm de ancho. Germinación conidial bipolar (Fig. 13).

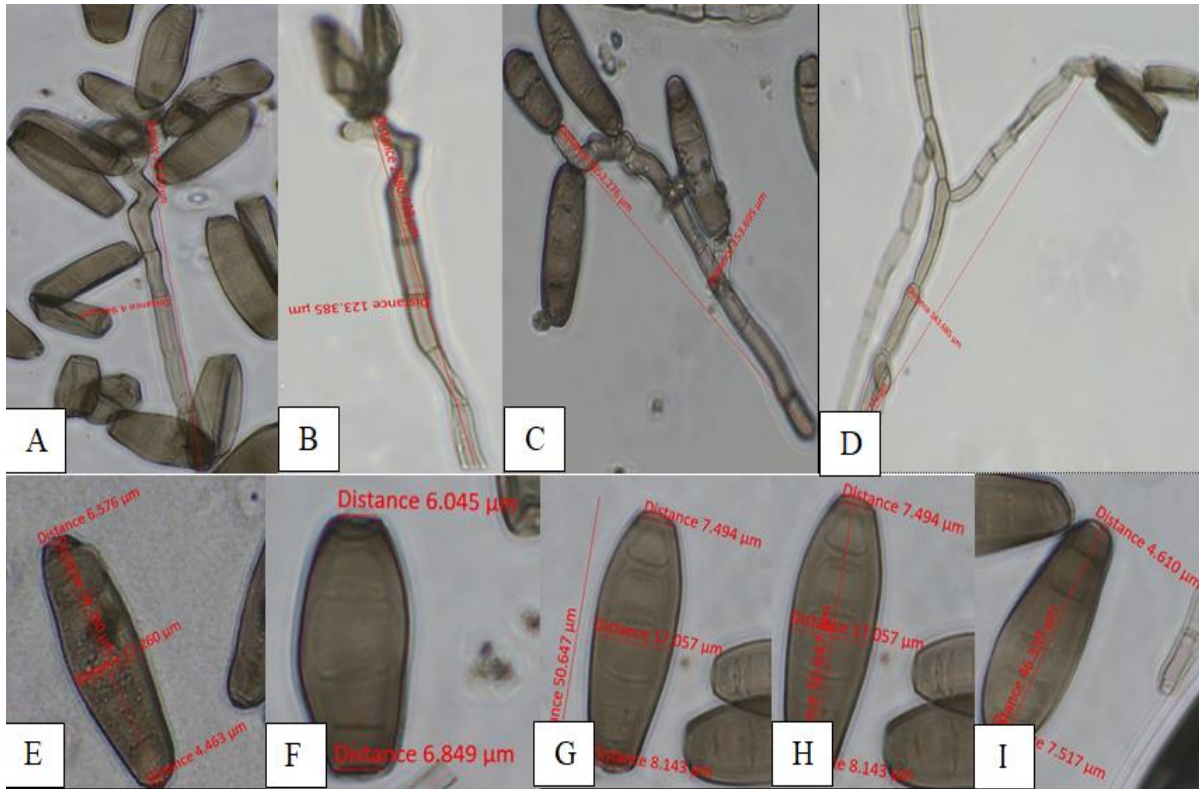


Figura 13. Identificación morfométrica del hongo causante de la negrilla.
 (A-D) Conidióforos, (E-I) Conidios. Objetivo de lente: 40 X.

8.2.2. Análisis filogenético de secuencias genómicas de ADN

Puesto que la identificación morfológica de los hongos tiene muchas limitantes, se secuenció la región ITS del agente causante de la negrilla. El análisis BLASTN de la secuencia ITS indicó que la cepa en estudio, nombrada como “*Bipolaris* LF BZ 001 (Agave)” es cercano molecularmente a *Bipolaris zeae* (Fig. 14).

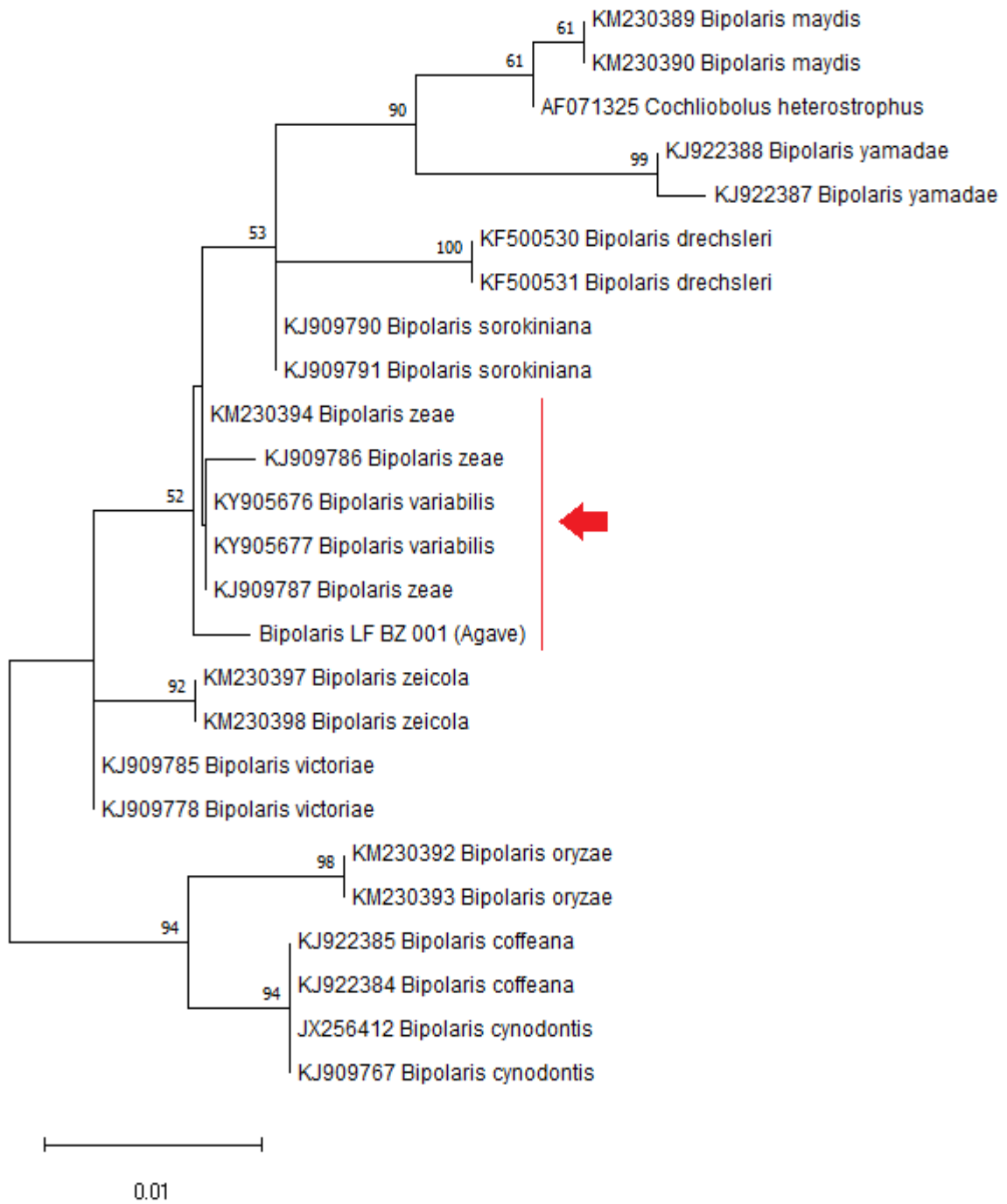


Figura 14. Árbol filogenético basado en secuencias de la región ITS del ADN de hongos. La flecha señala al hongo obtenido del estudio. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap.

8.3. Caracterización morfológica, estructural y molecular de las nanopartículas de plata (AgNPs)

Caracterización óptica de AgNPs

Mediante el espectrofotómetro UV-visible Thermo Scientific Serie GENESYS 10S, se realizó la caracterización óptica de las muestras coloidales sintetizadas y se obtuvieron las curvas de absorbancia de las AgNPs, los picos máximos de resonancia de plasmón de superficie resultantes para 45 y 150 ppm se encontraron a una longitud de onda de 432 nm para ambos analitos, tal como se muestra en la Figura 15. En cuanto a la absorción óptica de la plata, esta es más pronunciada conforme se incrementa la concentración de las AgNPs.

Las tonalidades amarillentas de las AgNPs dispersas en agua desionizada, son características y se relacionan con sus tamaños promedio. Esta peculiaridad se explica como la absorción óptica de radiación electromagnética a muy precisas longitudes de onda, debido a la oscilación coherente de los electrones de la banda de conducción, en respuesta a la interacción con el campo electromagnético, fenómeno físico conocido como Resonancia de Plasmones de Superficie (RPS).

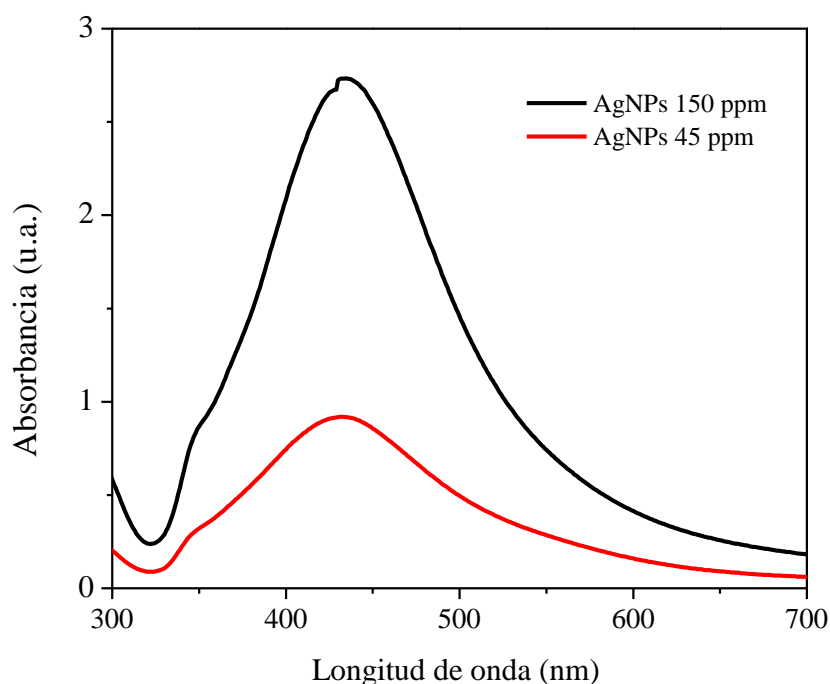


Figura 15. Curvas de absorbancia a diferentes concentraciones de AgNPs obtenidas por Espectroscopía Uv-vis.

Caracterización morfológica y estructural de AgNPs

Mediante el Microscopio Electrónico de Barrido (*SEM*, por sus siglas en inglés *Scanning Electronic Microscopy*) se identificó a las AgNPs como un coloide, fase sólida (nanopartículas de plata) dispersas en una fase líquida (solvente: agua desionizada), los cúmulos de nanopartículas obtenidas presentaron un tamaño promedio de 650 nm, 401 nm y 614 nm para las concentraciones de 80, 100 y 150 ppm, respectivamente. Durante las mediciones se observó la forma semiesférica de las AgNPs tal como se muestra en la Figura 16.

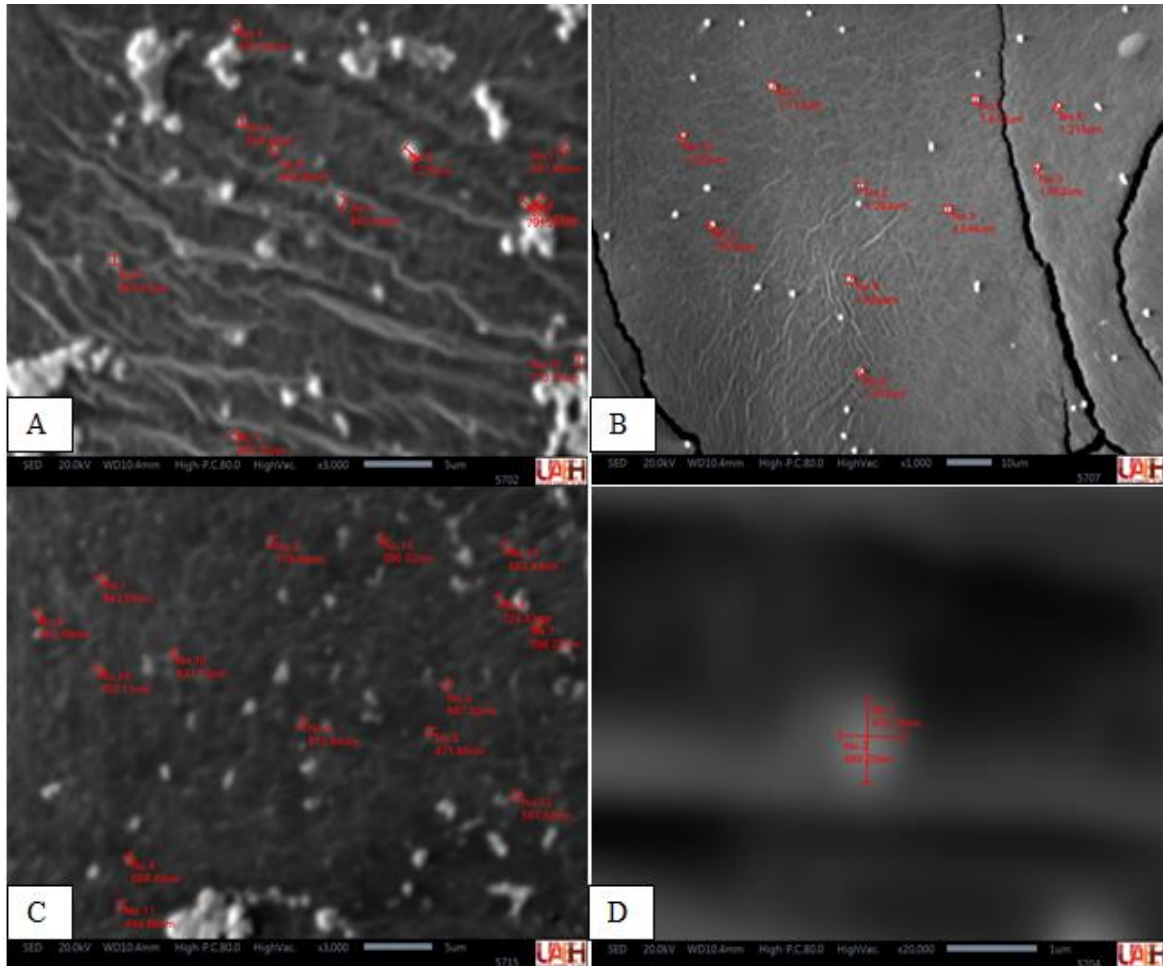


Figura 16. Micrografías representativas resultados de la caracterización de AgNPs a diferentes concentraciones con *SEM*. (A-C) Medición y caracterización de AgNPs a 80, 100 y 150 ppm y (D) Medición e identificación de forma semiesférica de nanopartícula a 80 ppm.

Análisis químico-elemental de nanopartículas de plata (AgNPs)

Para el análisis de las AgNPs se realizó por espectroscopía de rayos X dispersados, se analizaron los datos de varios espectros de las AgNPs en diferentes concentraciones y se obtuvo un promedio de cada una de ellas.

La composición promedio resultante de las nanopartículas de plata (AgNPs) a concentración de 80 ppm fue del 75% de carbono, 20% de oxígeno y 5% de plata; a una concentración de 100 ppm fue del 71% de carbono, 18% de oxígeno y 11% de plata, mientras que para la concentración de 150 ppm la composición promedio fue del 79% de carbono, 15% de oxígeno y 6% de plata.

Las siguientes figuras muestran los resultados de la composición de algunos espectros a diferente concentración (Fig. 17, 18 y 19).

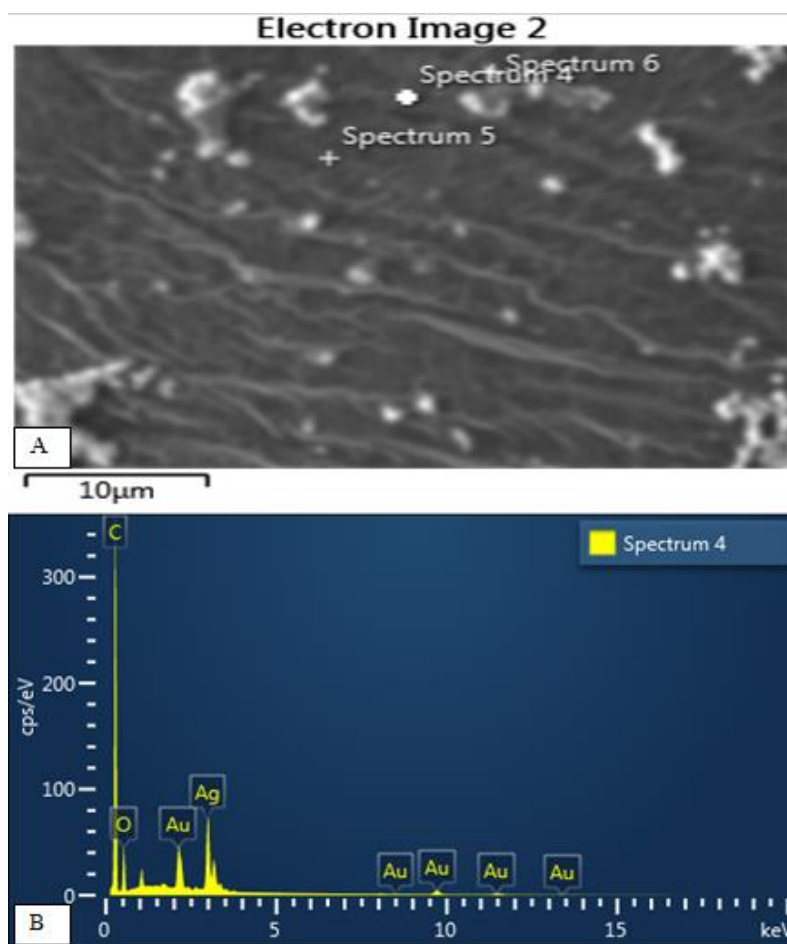


Figura 17. Caracterización e identificación de composición de las AgNPs a 80 ppm obtenidas por SEM. (A) Micrografía representativa de la caracterización de AgNPs a 80 ppm de diferentes espectros obtenidos por SEM, (B) Composición de AgNPs a 80 ppm correspondiente al espectro 4.

Electron Image 4

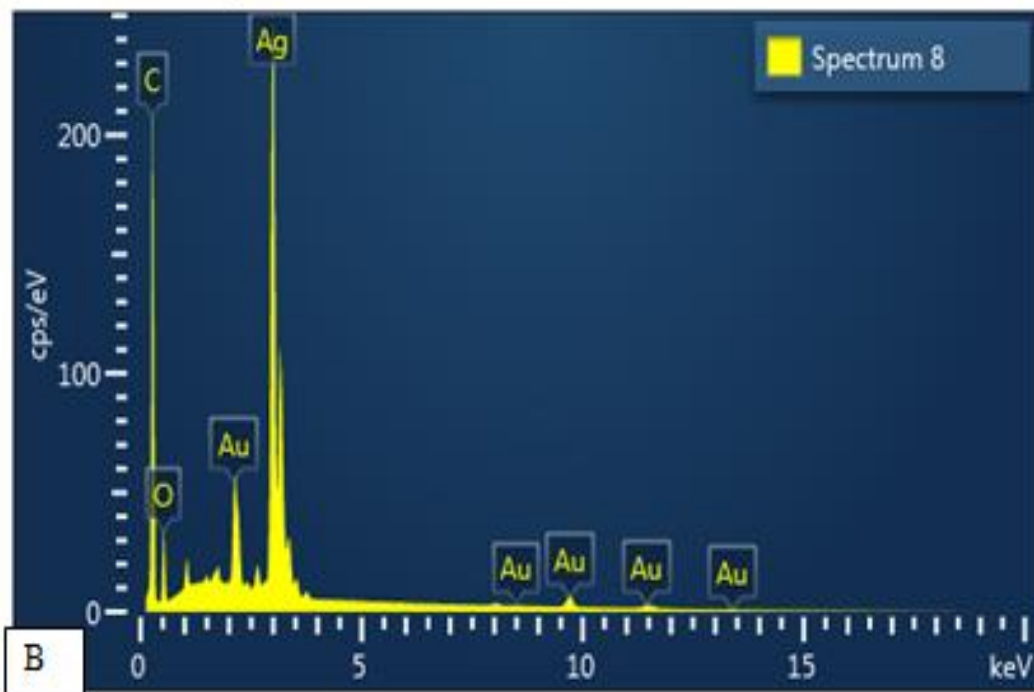
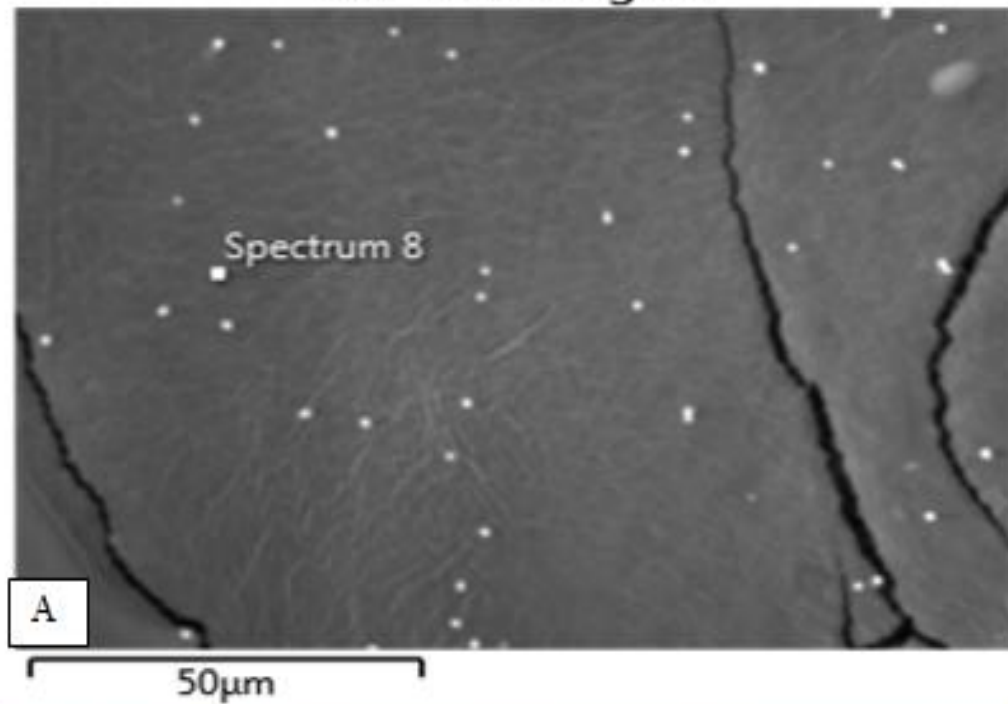


Figura 18. Caracterización e identificación de composición de las AgNPs a 100 ppm obtenidas por SEM. (A) Micrografía representativa de la caracterización de AgNPs a 100 ppm de diferentes espectros obtenidos por SEM, (B) Composición de AgNPs a 100 ppm correspondiente al espectro 8.

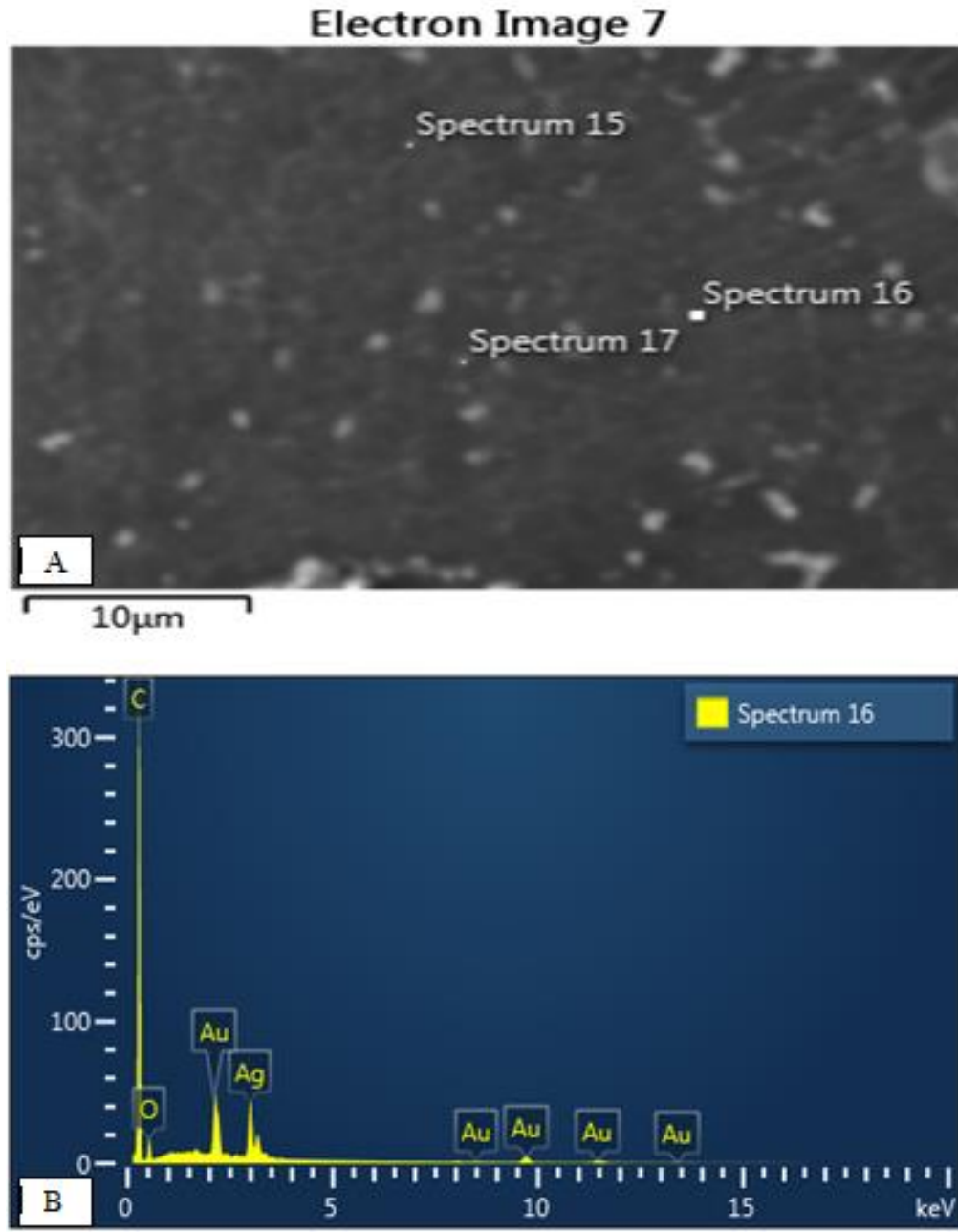


Figura 19. Caracterización e identificación de composición de las AgNPs a 150 ppm obtenidas por SEM. (A) Micrografía representativa de la caracterización de AgNPs a 150 ppm de diferentes espectros obtenidos por SEM, (B) Composición de AgNPs a 150 ppm correspondiente al espectro 16.

Como se aprecia en las figuras se observan distintos elementos químicos, esto es debido a que al estar las muestras en contacto con la atmósfera presentan una contaminación atmosférica, caracterizada por la presencia de elementos como el oxígeno y carbono, además de la presencia de oro por el recubrimiento que nos permite la incidencia de electrones en la muestra.

8.4. Evaluación del efecto de las nanopartículas de plata en el crecimiento *in vitro* del hongo

Para evaluar si las nanopartículas tenían un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo responsable de la negrilla, se añadieron nanopartículas de plata al medio PDA, alcanzando concentraciones finales de 0, 10, 30 y 45 ppm.

Como se observa en la Figura 20A, la presencia de AgNPs modificó la pigmentación del micelio, pues si bien, en ausencia de las AgNPs el micelio era color negro, en su presencia, indistintamente a su concentración, el micelio se tornó color crema. Asimismo, es importante hacer notar que la presencia de AgNPs afectó también el color del medio de crecimiento, pues a las concentraciones mayores el PDA se tornó negro-grisáceo. Respecto al crecimiento miceliar, se observó que las AgNPs inhibieron el crecimiento del hongo, indicando que el hongo es susceptible a dicho compuesto desde concentraciones muy bajas.

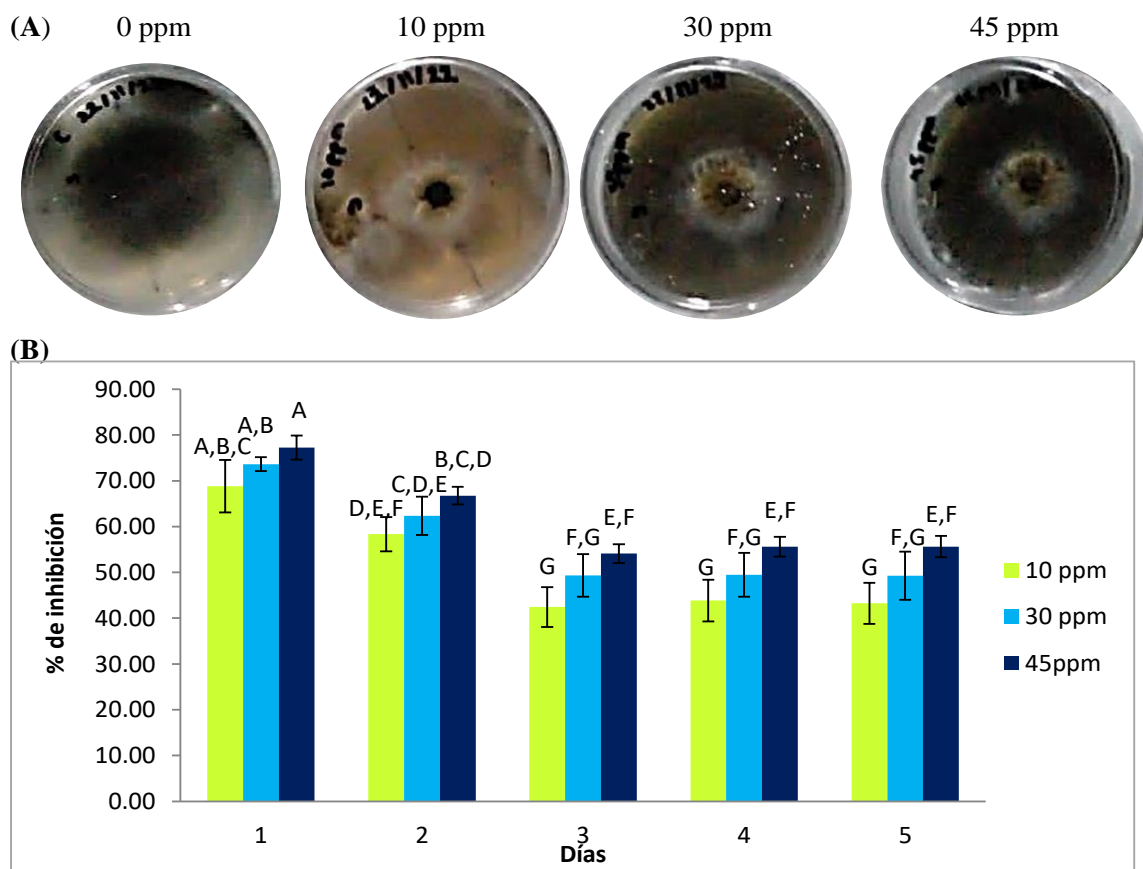


Figura 20. Inhibición *in vitro* del crecimiento del agente fitopatógeno a diferentes concentraciones de AgNPs en medio PDA.

(A) Crecimiento del hongo en medio PDA contaminado con diferentes concentraciones de AgNPs, (B) Porcentaje de inhibición del crecimiento radial. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa entre las cepas (Tukey, $p < 0.05$).

Para caracterizar mejor el efecto inhibitorio de las AgNPs sobre el hongo, se calculó el porcentaje de inhibición basado en el crecimiento radial. Tal como se aprecia en la Figura 20B, el máximo porcentaje de inhibición se observa con la concentración de 45 ppm, en los días 1 y 2, a partir del día 3, independientemente de la concentración, el porcentaje de inhibición disminuye con respecto a los primeros días.

8.5. Evaluación *in vivo* del efecto toxicológico de las nanopartículas de plata (AgNPs) sobre el fenotipo de los hijuelos de *A. salmiana*

Para descartar un posible efecto toxicológico de las AgNPs sobre las plantas, éstas se aplicaron sobre plantas sanas y se le realizó un seguimiento a los fenotipos en las zonas de infiltración a los 15, 28 y 70 días. Como se distingue en la Figura 21, las AgNPs, sin importar su concentración, no generaron daños observables en las plantas durante el periodo de evaluación estudiado.



Figura 21. Evaluación de efecto toxicológico en fenotipos de *A. salmiana* asperjados con diferentes concentraciones de AgNPs.

Fotografía representativa de planta asperjada con (A) 0 ppm, (B) 80 ppm, (C) 100 ppm y (D) 150 ppm de AgNPs a los 70 días de la aplicación.

8.5.1. Evaluación de incidencia

La incidencia indica la cantidad de plantas enfermas con respecto a la totalidad de plantas evaluadas (Nutter *et al.*, 2006). Para evaluar la eficiencia de las AgNPs para prevenir o disminuir los síntomas de enfermedad, se calculó la incidencia de la enfermedad mediante la ecuación número 4, en hijuelos de *A. salmiana* pretratados con AgNPs e inoculados con el agente fúngico a los 15, 28 y 70 días pre y post inoculación. En cada tratamiento se evaluó a 32 hijuelos (8 plantas para cada uno de los grupos).

Como se observa en la Tabla 8, la incidencia se mantuvo similar en el periodo evaluado, excepto a los 70 días pre-inoculación, donde en condiciones control se alcanzó el 100% de incidencia. De las tres concentraciones de AgNPs estudiadas, la de 150 ppm fue la que presentó menor incidencia de enfermedad.

Respecto al tratamiento correctivo (Tabla 8B), se observó que hubo una menor incidencia de enfermedad únicamente en la dosis de mayor concentración de AgNPs (150 ppm) comparado con las dosis de 80 y 100 ppm en todo el tiempo evaluado.

Tabla 8. Evaluación del porcentaje de incidencia en fenotipos de *A. salmiana* asperjados con AgNPs a diferente concentración a los 70 días pre y post inoculación.

(A)

Porcentaje de incidencia			
AgNPs (ppm)	Días pre-inoculación		
	15	28	70
0	87.5	87.5	100
80	75	75	75
100	87.5	87.5	87.5
150	62.5	62.5	62.5

(B)

Porcentaje de incidencia			
AgNPs (ppm)	Días post inoculación		
	15	28	70
0	100	100	100
80	100	100	100
100	87.5	100	100
150	50	50	50

(A) Porcentaje de incidencia en tratamiento preventivo con aplicación de AgNPs a diferentes concentraciones, pre-inoculación a los -7, -14 y 0 días, (B) Porcentaje de incidencia en tratamiento correctivo con aplicación de AgNPs a diferentes concentraciones, post inoculación a los 0, 7 y 14 días.

8.5.2. Evaluación de severidad

La severidad evalúa la frecuencia con la que se presentan las diferentes categorías de daño en relación con el total de plantas o hijuelos enfermos (Nutter *et al.*, 2006).

Para evaluar si los tratamientos preventivos y correctivos de AgNPs disminuían la severidad de la enfermedad, se aplicaron AgNPs a diferentes concentraciones en hijuelos de *A. salmiana* antes y después de la inoculación. Las evaluaciones se realizaron a los 70 días pre y post inoculación. En cuanto al nivel de severidad de cada tratamiento se asignó de acuerdo con la Tabla 6 de categorías de severidad, posteriormente para obtener el porcentaje de severidad por categoría se calculó mediante la ecuación número 5.

Tal como se muestra en la tabla 9A, para el tratamiento preventivo el máximo nivel de severidad que se presentó fue de 4. Sólo el grupo control, que no recibió tratamiento con AgNPs, tuvo plantas en esta categoría de severidad de la enfermedad. El nivel máximo de severidad observado a 80 y

100 ppm de AgNPs fue 3, mientras que para 150 ppm fue de 2, indicando que existe un efecto protector de las AgNPs de una forma dosis-respuesta, ya que, a mayor concentración, menor porcentaje de severidad.

Respecto al tratamiento correctivo (Tabla 9B), el nivel máximo de severidad fue de 4, sin importar el tratamiento usado; sin embargo, se observó un mayor número de plantas del grupo control con el nivel 4, a diferencia de los tratamientos correctivos (12.5%). En el grupo tratado con la mayor concentración de AgNPs, la mitad de su población no presentó sintomatología de enfermedad, indicando su eficiencia para contener la enfermedad.

Tabla 9. Evaluación del porcentaje de severidad en fenotipos de *A. salmiana* asperjados con AgNPs a diferente concentración a los 70 días pre y post inoculación.

(A)

AgNPs (ppm)	Porcentaje de severidad por categoría de severidad					
	0	1	2	3	4	5
0	0	37.5	25	12.5	25	0
80	25	25	37.5	12.5	0	0
100	12.5	12.5	62.5	12.5	0	0
150	37.5	50	25	0	0	0

(B)

AgNPs (ppm)	Porcentaje de severidad por categoría de severidad					
	0	1	2	3	4	5
0	0	0	12.5	50	37.5	0
80	0	12.5	25	50	12.5	0
100	0	37.5	37.5	12.5	12.5	0
150	50	25	12.5	0	12.5	0

(A) Porcentaje de severidad de tratamiento preventivo en fenotipos de *A. salmiana* asperjados con AgNPs a diferente concentración a los 70 días pre-inoculación, (B) Porcentaje de severidad de tratamiento correctivo en fenotipos de *A. salmiana* asperjados con AgNPs a diferente concentración a los 70 días post inoculación.

9. Discusión de Resultados

Los hongos generalmente son organismos microscópicos, que carecen de clorofila y de tejidos conductores. De las 100,000 especies de hongos conocidos, la mayoría son saprófitas y más de las 8,000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas (Agrios, 1998). La identificación de hongos se realiza por diferentes métodos, tales como medición morfométrica, basada en la observación y medición de estructuras diferenciales que permitan asociar a los especímenes con grupos taxonómicos de hongos (Carris *et al.*, 2012) o diagnóstico molecular, que comprende la amplificación de genes específicos, secuenciación y filogenia molecular.

De acuerdo con los resultados de las características macro y microscópicas obtenidas en el presente proyecto, se proponen a las especies *Bipolaris zea* y *B. variabilis* como los posibles agentes patogénicos causantes de negrilla en *A. salmiana*, hipótesis sustentadas por las claves taxonómicas de “Dematiaceous Hyphomycetes” de Martin, 1971 y “The genus *Bipolaris*” de Dimuthu *et al.*, 2014.

Para confirmar la identificación del hongo, se utilizaron además técnicas de biología molecular para la secuenciación de su ADN. Para ello, se tomaron como referencia los marcadores moleculares ITS-1 e ITS-4 propuestos por las claves taxonómicas anteriormente mencionadas. En concordancia con la identificación morfométrica se corroboró el género *Bipolaris*. Mediante el análisis de la secuencia a través del programa informático BLAST se obtuvo 99.78% de identidad con *B. zea*, mientras que *B. variabilis* presentó un porcentaje de identidad del 99.55% de manera que se sugiere que la especie *B. zea* o una especie altamente relacionada, es el agente patogénico causante de dicha enfermedad.

La identificación del presente proyecto no coincide con lo reportado por Hernández *et al.* (2022), quienes identificaron a *Curvularia lunata* como el agente responsable de la negrilla de *A. salmiana*. En dicho trabajo se realizó la caracterización macroscópica y microscópica encontrando a nivel género a *Curvularia* y, mediante identificación molecular usando los marcadores ITS-1 e ITS-4, encontraron a nivel especie a *C. lunata*. La diferencia de resultados podría explicarse por el complejo *Cochliobolus*, *Bipolaris* y *Curvularia*, especies taxonómicamente confusas debido a los cambios constantes en la nomenclatura de algunos de sus integrantes asexuales, los cuales se han diferenciado con base a la morfología de sus conidios (Piontelli, 2015). Dimuthu *et al.* (2012) concluyeron que no hay un límite morfológico claro entre dichos géneros, encontrando sinonimia en algunas especies de *Curvularia* y *Bipolaris*. Tras realizar análisis genéticos combinados de ITS, la gran subunidad (LSU) ADN, GPD y el gen del factor de elongación 1- α (EF1- α), tanto *Curvularia lunata* (anamorfo del teleomorfo *Cochliobolus lunatus*) como *Bipolaris zea* comparten taxonomía similar y pertenecen a este complejo estrechamente relacionado que podría llegar a suponer más de un agente fitopatogénico como causante de la negrilla (Zhang *et al.*, 2013; SENASICA, 2018).

Este reporte corrobora la identificación de *B. zea* como agente responsable de la negrilla, agente atípico del agave. El género *Bipolaris* ha sido aislado principalmente de pastos y otros integrantes de la familia Poaceae; sin embargo, también existen reportes en cultivos como la alcachofa, pitahaya, café, uva, jitomate entre otros (Ben-Ze'ev, 2011; Dimuthu *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2017).

Los métodos de control de la negrilla en agave son escasos, ya que recurren a métodos mecánicos en los que las pencas afectadas son retiradas y quemadas o enterradas. Este último control es una de las causas por las que se disemina la enfermedad, ya que las esporas pueden permanecer en el suelo y al entrar en contacto con animales o aire viajan hasta encontrar un nuevo hospedero, los métodos químicos como el uso de agroquímicos en especial los de amplio espectro pueden afectar la salud de los consumidores y productores, además de generar daños en el medio ambiente (Rodríguez *et al.*, 2017; Jiménez-Quintero *et al.*, 2016).

Por lo anterior, en este estudio se implementó el uso de nanopartículas de plata, por sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antivirales (Gupta *et al.*, 2018). El uso de las NPs fue explorado en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Para las condiciones *in vitro* se implementaron AgNPs a concentraciones de 10, 30 y 45 ppm, siendo 45 ppm la que mayor efecto inhibitorio presentó a partir del día 3. Este resultado coincide con Gutarowska *et al.* (2012), quienes reportaron que las AgNPs bajo la misma concentración de 45 ppm disminuyeron el 94% del crecimiento *in vitro* de diferentes hongos tales como *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Cladosporium cladosporoides*, *Alternaria alternata*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus nigricans*, entre otros; de igual manera Pietrzak y Gutarowska, (2015), las AgNPs a 45 ppm presentes en el medio de crecimiento disminuyeron el número de hongos (33–85%) y eliminaron algunas cepas de manera *in vitro*, por ejemplo, *Alternaria alternata* y *Cryptococcus laurentii*. Asimismo, Madeeha *et al.* (2023) utilizaron AgNPs para el control del tizón temprano causado por *Alternaria solani*, reportando que la tasa de inhibición aumentó del 20% al 81% con el aumento de la concentración de NPs, resultando máxima inhibición a 50 ppm, concentración similar a la utilizada en el experimento *in vitro*.

Respecto a las condiciones *in vivo*, primero se evaluó la toxicidad de las AgNPs sobre las plantas de *A. salmiana* y se encontró que la aspersión con estas partículas no generó daños sobre ellas, similar a lo reportado por Álvarez-Carvajal *et al.* (2021), quienes no observaron efectos tóxicos en las plántulas de tomate evaluadas. Sin embargo, no se puede garantizar la inocuidad de las partículas, pues sólo se analizó el fenotipo de las plantas. Existen reportes que aseguran que el ion de plata es la segunda forma más tóxica de un metal pesado, superado solo por el mercurio (Doudoroff and Katz, 1953; Albright *et al.*, 1972). De igual forma, se ha reportado que los iones Ag^+ , presentes en las AgNPs, sí generan toxicidad en las plantas de las familias Poaceae y Solanaceae, entre otras familias. Por ejemplo, las AgNPs a concentraciones de 10, 20, 40, 50 ppm aplicadas en trigo (*Triticum aestivum L.*) produjeron aberraciones cromosómicas (Abdelsalam *et al.*, 2018); las AgNPs utilizadas a una concentración de 0, 2, 10, 20 mg/L sobre plantas de papa (*Solanum tuberosum*) incrementaron el contenido de ROS, aniones y muerte celular (Bagherzadeh and Ehsanpour, 2016); las AgNPs a una concentración de 800 $\mu g/kg$ en haba (*Vicia faba*) disminuyeron la germinación, longitud de brotes y raíces, así como retrasó en nodulación de la raíz (Abd-Alla *et al.*, 2016).

La diferencia de resultados en comparación con los obtenidos en el tratamiento toxicológico *in vivo*, no solo se explica por el uso de concentraciones propuestas por estudios en los que reportaron toxicología nula (Álvarez-Carvajal *et al.*, 2021) o por la morfología del agave el cual por tener fibras en las hojas le aporta mayor rigidez en comparación con otras familias de plantas (García-Mendoza, 2007), sino también, se debe a que los fenotipos de *A. salmiana* estuvieron en condiciones controladas, sin contacto directo al sol u otros factores tanto bióticos como abióticos que promovieran mayor liberación de iones Ag^+ , tal como lo afirma Klein *et al.* (1998), en su

estudio de árboles tratados con AgNPs, quienes encontraron que el contenido de plata presente en los mismos dependía de la exposición a los rayos solares y las variaciones estacionales.

Sobre la efectividad del tratamiento de las AgNPs para el control de la negrilla, en el presente trabajo se evaluaron concentraciones de 80, 100 y 150 ppm, dosis similares a las utilizadas para controlar a los fitopatógenos *Xanthomonas perforans*, *Aspergillium flavus*, *Penicillium verrucosum*, *Fusarium chlamydosporum* y *Fusarium oxysporum* en los cultivos de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y rábano blanco (*Raphanus sativus* var. *aegyptiacus*) (Mathews *et al.*, 2013; Safaa *et al.*, 2015 y Álvarez-Carvajal *et al.*, 2021). De acuerdo con los resultados tanto para el tratamiento preventivo como el correctivo, la dosis en la que se observó una menor incidencia y severidad fue la de 150 ppm, coincidiendo con lo reportado por Safaa *et al.* (2015) para el control de los fitopatógenos *Aspergillium flavus*, *Penicillium verrucosum* y *Fusarium chlamydosporum* en plantas de jitomate. En dicha investigación se implementaron AgNPs a concentraciones de 0, 50, 100, 150 y 200 ppm, de ellas la de 150 ppm fue la que presentó mejor inhibición en el crecimiento *in vivo* de *F. chlamydosporum* y *A. flavus* de aproximadamente un 50%.

Debido a que los experimentos *in vivo* no tuvieron repeticiones, no se puede garantizar que los resultados sean reproducibles, por lo que se recomienda tener más repeticiones.

10. Conclusiones

Las nanopartículas de plata inhiben el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Bipolaris zeae*, hongo fitopatógeno identificado como responsable de la enfermedad “negrilla” en *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck. Este tratamiento también resulta efectivo contra la infección de plantas inoculadas con el agente patogénico tanto para su manejo preventivo como correctivo, aportando una herramienta en la fitosanidad del cultivo alternativa a los fungicidas convencionales.

11. Referencias

- Abd-Alla, Mohamed H., Nivien A., N. and Mamdouh K., D. (2016). Assessment of silver nanoparticles contamination on fababean-*Rhizobium leguminosarum* bv. viciae-Glomus aggregatum symbiosis: Implications for induction of autophagy process in root nodule. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2016, 218, 163–177.
- Abdel-Fattah, G. M., Shabana, Y. M., Ismail, A. E. and Rashad, Y. M. (2007). *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. *Mycopathologia*, 164: 81-89.
- Abdelsalam, N. R.; Abdel-Megeed, A., Ali, H. M.; Salem, Mohamed Z. M., Al-Hayali, M. F. A.; Elshikh, M. S. (2018). Genotoxicity effects of silver nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum* L.) root tip cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018, 155, 76–85.
- Agrios G. (1998). *Fitopatología*. 3ra Edición. Limusa. México. 371 p.
- Aguilar J., B., Enríquez del V., J. R., Rodríguez O., G., Granados S., D., Martínez C., B. (2014). The current state of *Agave salmiana* and *A. mapisaga* in the valley of Mexico. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca (ITVO), Ex hacienda Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca. C.P. 71230. México. *Revista Mexicana de Agroecosistemas* Vol. 1(2): 106-120-93.
- Ahn, I. P. and Suh, S. C. (2007). Calcium/Calmodulin dependent signaling for prepenetration development in *Cochliobolus miyabeanus* infecting rice. *Journal of General Plant Pathology*, 73: 113-120.
- Alarcon, E. I., Griffith, M. and Udekwu, K. I. (2015). Silver nanoparticle applications in the fabrication and design of medical and biosensing devices. University of Ottawa Heart. Institute Ottawa, Canada. Springer International Publishing Switzerland 2015. DOI 10.1007/978-3-319-11262-6.
- Albright, L., J., Wilfred W., J. and M. W., E. (1972). Technique for measuring metallic salt effects upon the indigenous heterotrophic microflora of a natural water. *Water Res* 6: 1589–1596.
- Álvarez C., F., Encinas B., D. A., Armenta C., A., González S., T. E., Esquer M., E., Juárez O., J. y Méndez I., R. (2021). Nanopartículas de plata recubiertas con quitosano contra la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* en plántulas de tomate. *Biotec*. <http://biotecnia.unison.mx>.
- Anees A., S., Sachi D., S., Khatoun, A., Tahir A., M., Afzal, M., Saquib H., M. and Kumar N., A. (2020). Bactericid Activity of Silver Nanoparticles: A Mechanistic Review. *Mater Sci Energy Technol*.
- APG III. (2009). An update of the angiosperm phylogeny group classification for orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 61: 105-121.
- APG IV. (2016). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1): 1-20.
- Aslani, F., Bagheri, S., Muhd J., N., Juraimi, A. S., Hashemi, F. S. G. and Baghdadi, A. (2014). Effects of engineered nanomaterials on plants growth: An overview. *Sci. World J.*
- Aziz, N., Pandey, R., Barman, I. and Prasad, R. (2016). Leveraging the attributes of *Mucor hiemalis*-derived silver nanoparticles for a synergistic broad-spectrum antimicrobial platform. *Front Microbiol* 7:1984.
- Bagherzadeh H. and Ehsanpour, A. A. (2016). Silver nanoparticles and silver ions: Oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L.) grown *in vitro*. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 2016, 57, 544–553.
- Balashanmugam, P., Balakumaran, M. D., Murugan, R., Dhanapal, K. and Kalaichelvan, P. T. (2016). Phytogetic synthesis of silver nanoparticles, optimization and evaluation of *in vitro* antifungal activity against human and plant pathogens. *Microbiol Res* 192:52–64.

- Banco Nacional de ADN Carlos III. (2020). Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III. Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN. Universidad de Salamanca. www.bancoadn.org
- Becerra, L. (1988). El pulque, ancestral bebida obtenida del árbol de las maravillas. *Revista Nueva Antropología*, X, 195-198.
- Beer, J., Harvey, C., Ibrahim, M., Harmand, J. M., Somarriba, E. y Jiménez, F. (2003). Servicios ambientales de los sistemas agroforestales. *Agroforestería en las Américas*. 10(37-28):80- 87.
- Ben-Ze'ev, I. S., Assouline, I., Levy, E. (2011). First report of *Bipolaris cactivora* causing fruit blotch and stem rot of dragon fruit (pitaya) in Israel. *Phytoparasitica* 39, 195–197. <https://doi.org/10.1007/s12600-011-0143-y>
- Breña C., L., O. Domínguez, D. y A. González, M. (2010). Estrategia de exportación de pulque enlatado. Tesina. Instituto Politécnico Nacional. UPIICSA. México. D. F. 151 p.
- Bryaskova, R., Pencheva, D., Nikolov, S. y Kantardjiev, T. (2011). Synthesis and comparative study on the antimicrobial activity of hybrid materials based on silver nanoparticles (AgNPs) stabilized by polyvinylpyrrolidone (PVP). *J Chem Biol* 4(4):185–191.
- Cabiscol, E., Tamarit, J. and Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3:3–8.
- Carreño B., Gabriela C., González A., América F., Martínez H., María G., Gutiérrez L., Carlos I. y Guerrero G., Nara A. (2013). Elaboración y caracterización de producto cárnico tipo mixiote. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos Carreño et al./ Vol. 1, No. 2* (2016) 685-690 685. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Tecnología de alimentos., Aguascalientes, Ags., México.
- Carris, L. M., Little, C. R. and Stiles, C. M. (2012). Introduction to fungi. The Plant Health Instructor. Recuperado el 20 abril de 2018: <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroFungi.aspx>.
- Castro, P. F. (2006). Colapsos ambientales, transiciones culturales. Instituto de Investigaciones Antropológicas, UNAM. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. 475 p.
- Chauhan, N., Tyagi, A. K., Kumar, P. and Malik, A. (2016). Antibacterial potential of *Jatropha curcas* synthesized silver nanoparticles against food borne pathogens. *Front. Microbiol* 7, 1–13.
- Clement, J. L. and Jarrett, P. S. (1994). Antibacterial silver. *Met Based Drugs* 1:467–482.
- Corcuera de Mancera, S. (2013). El fraile, el indio y el pulque: evangelización y embriaguez en la Nueva España (1523-1548). Fondo de Cultura Económica. México. 309 p.
- Cushing, B. L., Kolesnichenko, V. L. and Oconnor, C. J. (2004). Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. *Chem. Rev.* 104, 3893–3946.
- Díaz-Martínez, Erika I. (2019). *Trichoderma spp.* para el control de *Asterina mexicana* agente causal de la viruela o negrilla de maguey pulquero. División de ciencias de la salud, biológicas y ambientales. Universidad Abierta y a Distancia de México.
- Dieter V., Wiley, V. C. H., Verlag, G. H., and K. G., Boschstr. (2013). *Nanomaterials an introduction to synthesis, properties, and applications*. Second Edition.
- Dietz, John K. and Herth, S. (2011). Plant nanotoxicology. *Trends Plant Sci.* 16, 582–589.
- Dimuthu, S., Manamgoda, A.Y. Rossman, L.A. Castlebury, P.W. Crous, H. Madrid, E. Chukeatirote, K. D. Hyde. (2014). The genus *Bipolaris*, *Studies in Mycology*. Vol. 79, 221-288 pp. ISSN 0166-0616.

- Dimuthu, S., Manamgoda, Cai, L., McKenzie, Eric H. C., W. Crous, P., Madrid, H., Chukeatirote, E., Shuvas, R. G., Yu Pei Tan and Hyde, K. D. (2012). A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* – *Cochliobolus* – *Curvularia* complex. *Fungal Diversity* 56: 131–144.
- Domínguez-Rosales, M. S. (2009). Desarrollo de herramientas biotecnológicas para la propagación masiva y mejoramiento de especies del género *Agave*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Centro de Ciencias Básicas. Departamento de química.
- Doudoroff, P. and Katz, M. (1953). Critical review of literature on the toxicity of industrial wastes and their components to fish, II: The metals, as salts. *Sewage Ind Wastes* 25: 802–812.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Drake, P. L. and Hazelwood, K. J. (2005). Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. *Ann Occup Hyg* 49:575–585.
- Duarte, Y., Pino, O. y Martínez, B. (2014). Efecto de cuatro aceites esenciales sobre hongos asociados al manchado del arroz. *Revistas de Protección Vegetal*, 29(1): 62-65.
- Durán, N., Durán, M., de Jesús M. B., Seabra, A. B., Fávoro, W. J. and Nakazato G. (2016). Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nonmedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(3), 789-799.
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N. and Kim, J. O. (2008). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 52:662–668.
- Feng, Q. L., J. Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*.
- Fournier G., P. y Mondragón B., L. (2012). Las bebidas mexicanas. Pulque, mezcal y tesguino. *Arqueología Mexicana*, Volumen XIX, número 114, marzo – abril de 2012, México. pp. 53-59.
- Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G. and Galdiero, M. (2015). Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. *Molecules*. 20 (5), 8874.
- Gaceta del Senado. (2017). Ley general de protección y fomento del *Agave salmiana*. LXIII/3PPO-54-2178/77366.
- Gallardo V., J. (2017). Breviario mezcalero. Regionalismos y términos comunes, antiguos y contemporáneos del proceso de la elaboración del mezcal. CIATEJ - Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Programa de Redes Temáticas CONACYT - Continuidad de redes 2016. ISBN: 978-607-97548-1-5.
- Gallardo V., J. y Solís M., V. M. (2017). El Mezcal de Aguascalientes. Denominación de origen. Instituto Cultural de Aguascalientes Venustiano Carranza 101, Zona Centro, C.P. 20000 Aguascalientes, Ags. pp. 154.
- Gallou, A., Sauste D., Alba P., Serna D., Maríz G. y Andrade M., Gilda Y. (2015). Manual practicas del laboratorio de biología molecular. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. SENASICA. 98 pp. ISBN: 978-968-5384-09-4.
- Gao, S., Liu, T., Li, Y., Wu, Q., Fu, K. and Chen, J. (2012). Understanding resistant germplasm-induced virulence variation through analysis of proteomics and suppression subtractive hybridization in a maize pathogen *Curvularia lunata*. *Proteomics*. 12:3524–3535. DOI: 10.1002/pmic.201200105.
- García A., T., Doyle, V., Singh, R. and Price, T. (2018). First report of *Curvularia* leaf spot of corn, Caused by *Curvularia lunata*, in the United States. <https://doi.org/10.1094/PHP-02-18-0008-BR>.

- García, M. A. (1992). Con sabor a maguey. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 114 p.
- García-Gutiérrez, C. y Rodríguez-Meza, G. D. (2012). Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai*, 8(3b),1-10. [Fecha de Consulta 6 de noviembre de 2022]. ISSN: 1665-0441. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46125177005>.
- García-Herrera, E. J., Méndez-Gallegos, S. J. y Talavera-Magaña, D. (2010). El género *Agave spp.* en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 5: 109-129.
- García-Mendoza, A. J. (2007). Los Agaves de México. *Ciencias* 87: 14-23. Jardín Botánico. Universidad Autónoma de México. Distrito Federal México.
- Geisler-Lee, J., Wang, Q., Yao, Y., Zhang, W., Geisler, M., Li, K., Huang, Y., Chen, Y., Kolmakov, A. and Ma, X. (2013). Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology* 2013, 7, 323–337.
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of continental North America*. University of Arizona Press. Tucson, 670 pp.
- González Á., M. (2005). Revisión taxonómica de la sección *salmianae* berger del género *Agave L.* (Agavaceae). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de ciencias biológicas. Subdirección de posgrado.
- González M., J. D. (2009). Pulque, la bebida de los dioses al alcance de todos Corporativo Magueyeros San Isidro SA de C.
- Gordon, O., Vig S., T. N., Brunetto, P. S., Villaruz, A. E., Sturdevant, D. E., Otto, M., Landmann, R. and Fromm, K. M. (2010). Silver coordination polymers for prevention of implant infection: Thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4208–4218.
- Granados S., D. (1993). Los agaves de México, Universidad Autónoma de Chapingo. México, 252 pp.
- Gupta, N., Prakash U., C., Singh, A., Abd E., Kamel A. and Prasad, R. (2018). Applications of silver nanoparticles in plant protection. *Nanotechnology in the life sciences*.
- Gurrola G., J. A. (2002). Efecto del inoculante comercial BuRIZE (*Glomus intraradices*) en Maguey mezcalero (*Agave durangensis*). Memoria de residencia profesional. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 1. Durango, Dgo. México.
- Gutarowska, B., Skora, J., Zduniak, K., Rembisz, D. (2012). Analysis of the sensitivity of microorganisms contaminating museums and archives to silver nanoparticles. *ELSEVIER. International Biodeterioration & Biodegradation*. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.12.002>.
- Hatchett, D. W. and Henry, S. (1996). Electrochemistry of sulfur adlayers on the low-index faces of silver. *J Phys Chem* 100:9854–9859.
- Heinlein, M. and Epel, B.L. (2004). Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata. *Int. Rev. Cytol.* 2004.
- Hernández José, J., Hernández D. Edna M., López V., E. y Álvarez C., J. (2022). Aislamiento e identificación del fitopatógeno causal de viruela o negrilla en *Agave salmiana* de municipios del estado de Hidalgo, México.
- Hernández R., S. (2012). Control del oscurecimiento no enzimático en miel de maguey (*Agave mapisaga*). Tesis de Ingeniería en Agroindustrias. Universidad Autónoma Chapingo. Edo. de México. 117 p.
- Hernández, F. (1959). Historia natural de las plantas de la Nueva España. Universidad Nacional Autónoma de México. Tomo II. México. Prensa Universitaria.

- Hill, W. R. and Pillsbury, D. M. (1939). *Argyria: the pharmacology of silver*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins Company
- Hollinger, M. A. (1996). Toxicological aspects of topical silver pharmaceuticals. *Crit Rev Toxicol*; 26: 255–60.
- Hornyak, G. L., Dutta, J., Tibbals, H. F. and Rao, A. A. (2008). *Introduction to nanoscience*. Taylor & Francis Group, LLC.
- Illsey G., C., Gómez A., T., Rivera M., G., Morales M., M del P., García B., J., Ojeda S., A., Calzada R., M. y S. Mancilla N. (2005). Conservación *in situ* y manejo campesino de magueyes mezcaleros. Grupo de Estudios Ambientales AC. Ciudad de México: Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. V028.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (Inifap). (2006). Establecimiento y manejo de plantaciones comerciales de maguey para la extracción de aguamiel en el sureste de Coahuila. Centro de Investigación Regional del Noreste Campo Experimental Saltillo. Folleto Técnico Núm. 23.
- Ito, S. (1930). On some news ascigerous stage in culture of *Helminthosporium* parasitic on cereals. *Proc. Imp. Acad (Japan) Suppl.*, 6: 352-355.
- James, R. C., Roberts, S. M. and Williams, Phillip L. (2000). *General principles of toxicology. Principles of toxicology: environmental and industrial applications*, 2nd edn. New York: John Wiley and Sons, Inc. pp. 3–4. ISBN 0-471-29321-0.
- Jiménez-Quintero, Cristian A., Pantoja-Estrada, A. and Ferney-Leonel, H. (2016). Health risks of farmers for using and handling pesticides in the watershed: La Pila. *Rev Univ. Salud*. 2016;18 (3):417-431. DOI: <http://dx.doi.org/10.22267/rus.161803.48>.
- Job B., E. and Matlack E., B. (1900). New species of fungi from various localities with notes on some published species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 27(2):49-64.
- Jyutika M., R., Jain J., Sumit, A., Omray, P., Khandelwal, S., K. M. Paknikar and *Mol. Pharm.* (2009). Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use.
- Katarzyna P. and Beata G. (2015). Influence of the silver nanoparticles on microbial community in different environments. *Acta ABP Biochimica Polonica*. Institute of Fermentation Technology and Microbiology, Lodz University of Technology, Łódź, Poland. http://dx.doi.org/10.18388/abp.2015_1118.
- Kaveh, R., Li, Y.-S., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C. L. and Van Aken, B. (2013). Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environ. Sci. Technol.*
- Khaled M., Mohamed R. and El-Sanabary, A. (2022). Fabrication, characterization and properties of silver nanoparticles using poly (MAA)–chitosan graft copolymer as an ecofriendly non-fibrous textile. ISSN: 0369-9420
- Klein, D. A., Dowden H. and Ross, Inc. (1978). Environmental impacts of artificial ice nucleating agents, USA, pp 109–126.
- Kumar G., R. (2018). *Nanomaterials and nanocomposites synthesis, properties, characterization techniques, and applications*.
- Larue, C., Castillo-Michel, H., Sobanska, S., Cécillon, L., Bureau, S., Barthès, V., Ouerdane, L., Carrière, M. and Sarret, G. (2014). Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: Evidence for internalization and changes in Ag speciation. *J. Hazard. Mater.* 264, 98–106.

- Li Xu, Y., Yi-Yi W., Jie Huang, Chun-Yuan C., Zhen-Xing W., and Hui Xie. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. DOI: 10.7150/thno.45413.
- Li, C.-C., Dang, F., Li, M., Zhu, M., Zhong, H., Hintelmann, H. and Zhou, D.-M. (2017). Effects of exposure pathways on the accumulation and phytotoxicity of silver nanoparticles in soybean and rice. *Nanotoxicology*. 11, 699–709.
- Link, H. F. (1809). *Observationes in ordines plantarum naturales*. Dissertatio 1: 1-33.
- López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A. and Mendoza-Díaz, G. (2003). Molecular Structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and food chemistry*. Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato y Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto., 36050 México.
- Luna V., B. (2012). Caracterización socioeconómica de los recolectores de insectos comestibles asociados al maguey en Pinos, Zacatecas. Maestría en Ciencias de Desarrollo Rural. Universidad Autónoma Chapingo México, Edo. México. 199.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y. and Kolmakov, A. (2010). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Sci Total Environ* 408(16):3053–3061
- Madeeha A., Shakil A., Asim A., Najwa A., Hamas, Haysam M. Ali M. Tajammal K., Inzamam U. H., Qamar uz Z. (2023). Green synthesized silver nanoparticles: A novel approach for the enhanced growth and yield of tomato against early blight disease. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040886>.
- Madrigal, L. R., García, M. E. y Velázquez, L. A. (2014). El maguey: cultivo y cultura. El maguey y el pulque en la región central de México. México: Gobierno del Estado de Tlaxcala. Fideicomiso Colegio de Historia de Tlaxcala. Pp.137-157.
- Madrigal, L. y Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. SCIELO. Universidad Simón Bolívar, Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Caracas, Venezuela. ISSN 0004-0622.
- Magos L., N. A., Hernández G., E. y Cobos P., F. J. (2016). Las plantas del futuro (Fotosíntesis CAM). Diario Xalapa. Ciencia y Luz. Universidad Veracruzana.
- Maloy, O. C. (2005). Plant disease management. The plant health instructor. DOI: 10.1094/PHI-I2005-0202-01.
- Manzar, N., Kashyap, A. S., Maurya, A., Rajawat, M. V. S., Sharma, P. K., Srivastava, A. K., Roy, M., Saxena, A. K. and Singh, H. V. (2022). Multi-gene phylogenetic approach for identification and diversity analysis of *Bipolaris maydis* and *Curvularia lunata* isolates causing foliar blight of *Zea mays*. *J. Fungi* 2022, 8, 802. <https://doi.org/10.3390/jof8080802>.
- Marin-Felix, Y., Groenewald, J. Z., Cai, L., Chen, Q., Marincowitz, S., Barnes, I., Bensch, K., Braun, U., Camporesi, E., Damm, U., de Beer, Z. W., Dissanayake, A., Edwards, J., Giraldo, A., Hernández-Restrepo, M., Hyde, K. D., Jayawardena, R. S., Lombard, L., Luangsa-ard, J., McTaggart, A. R., Rossman, A. Y., Sandoval-Denis, M., Shen, M., Shivas, R. G., Tan, Y. P., van der Linde, E. J., Wingfield, M. J., Wood, A. R., Zhang, J. Q., Zhang, Y. and Crous P. W. (2017). Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1.
- Martin B., E. (1971). *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 608.

- Martínez, A. E. (2003). Determinación del patosistema del agave y búsqueda de hongos micorrízicos benéficos en el Estado de Durango. Memoria de residencia profesional. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 1. Durango, Dgo. México.
- Martínez-Castañón, G. A., Niño-Martínez, N., Martínez-Gutierrez, F, Martínez-Mendoza, J. R., and Ruiz, F. (2008). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research* volume 10, pages1343–1348.
- Mathews L., P., Ismail O., Muserref A. O., Sanju K., Tao C., Mingxu Y., and Weihong Tan. (2013). Nanotechnology in plant disease management: DNA directed silver nanoparticles on graphene oxide as an antibacterial against *Xanthomonas Perforans*. *ACS Nano*. DOI: 10.1021/nn4034794.
- Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S. and Tsuchido, T. (2003). Mode of bacterial action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl Environ Microbiol* 69:4278–4281.
- Mitsuoka, T. (1982). Bifidobacteria and microflora. Recent trends in reasearch on intestinal flora, 1 (1): 3, 24.
- Moncada de la F, J.; Anaya, G. M.; Ortiz, S. C. y Sánchez, G. P. (2013). Suelo. Protejamos el suelo que nos da vida. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México. Folleto técnico.
- Montañez-Soto, J., Venegas-González, J., Vivar-Vera, M. y Ramos-Ramírez, E. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en las cabezas y en las hojas *del Agave Tequilana weber azul*. En Arizmendi CD. 2016. (Eds). Elaboración de polímeros naturales injertados con compuestos antioxidantes y evaluación de sus propiedades funcionales. Tesis de maestría de la universidad autónoma del estado de México. 8 P.
- Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B. y Aguirre R., J. R. (2011). Variación morfológica y humanización de la Sección *salmiana* del género Agave. *Agrociencia*, 45, 465–477.
- Morishima, K. (2010). Guía del Manejo Integrado de Plagas (MIP) para técnicos y productores. Versión 1. Proyecto para el mejoramiento del consumo y la disponibilidad de alimentos en comunidades de la provincia de veraguas. MINSA, MIDA, MEDUCA-JICA.
- Nair, P. M. G. and Chung, I. M. (2014). Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*
- Narváez S., A. U., Jiménez V., M. A. y Martínez S., T. (2016). El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola*, (56), 33-44. ISSN: 0186-4394.
- Narváez S., Alberto U., Cruz L., A. y Sangerman-Jarquín, Dora Ma. (2020). Servicios ambientales: sistema agroforestal tradicional con plantas de maguey pulquero en la Altiplanicie, Hidalgo.
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., and Behra, R. (2008). Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Netala, V. R., Kotakadi, V. S., Nagam, V., Bobbu, P., Ghosh, S. B. and Tartte, V. (2014). First report of biomimetic synthesis of silver nanoparticles using aqueous callus extract of *Centella asiatica* and their antimicrobial activity. *Appl. Nanosci.* 2014, 5, 123–129.
- Nieto-Aquino, R., Vargas M., J., Nieto A., Julio C., Rodríguez O., A., Jiménez P., Víctor M., Hernández C., J. y Ortiz B., M. (2016). Manejo agronómico del maguey pulquero (*Agave salmiana*) en el Valle de Mezquital. Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, Carretera Tepatepec-San Juan Tepa km 2, Francisco I. Madero, Hidalgo. Primera edición. ISBN: 978-607-9260-18-7.
- NIOSH. (1992). Reports and Memoranda. NIOSH Publication No. 92-100. U.S. Department of Health, Education, and Welfare.

- NIOSH. (2003). Registry of toxic effects of chemical substances (RTECS): silver. VW3500000 (last updated August 2003) Cincinnati, OH: National Institute for Occupational Safety and Health.
- Nisikado, Y. (1928). Studies on *Helminthosporium diseases* of *Gramineae* in Japan. Sp. Rep. Ohara Inst. Agric. Res. 4: 1- 384 (in Japanese). English translation in Ber. Ohara. Inst. Landw. Forsch. 4: 11-126, 1929.
- Nisikado, Y. (1929). Preliminary notes on yellow spot disease of wheat caused by *Helminthosporium tritici-repentis*. Ber. Ohara Inst. Landw Forsch. 4: 103- 109.
- Nobel S., P. (1988). Environmental Biology of Agaves and Cacti. Cambridge, UK: Cambridge University Press. ISBN: 0-521- 54334-7; ISBN-13: 978-0521343220.
- Nobel, S. P. (1998). Environmental Biology of Agaves and Cacti. Cambridge, UK: Cambridge University Press. ISBN: 0-521- 54334-7; ISBN-13: 978-0521343220.
- Nutter, Forrest W., Esker, Paul D. and Coelho N., Rosalee A. (2006). Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease Data. DOI: 10.1007/1-4020-5020-8_7.
- NYBG. (2022). Disponible en: <http://sweetgum.nybg.org/science/vh/specimen-details/?irn=256864>.
- Okkyoung C., Kathy K. Deng, Nam-Jung Kim, Louis R. Jr., Rao Y. Surampalli and Zhiqiang Hu. (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth.
- Olivier, G. (2012). Los dioses ebrios del México antiguo. De la transgresión a la inmortalidad. Arqueología Mexicana. Volumen XIX, número 114, marzo–abril de 2012, México. pp. 26-33.
- OSHA. (1989). United States code of federal regulations, 29 CFR Part 1910.1000, Air contaminants, final rule. Vol. 54. Washington, DC: Occupational Safety and Health Administration. p. 2702.
- Otoni, G., Ferreira de Oliverira, W., Silva, A. L., Albernaz, K. C., Silva, E. G., Cardoso, E. and Guicherit, E. (2000). Eficiencia de funguicidas no controle de mancha no controle de mancha parda (*Bipolaris oryzae*) en arroz (*Oryza sativa*). Pesquisa Agropecuaria Tropical, 30(2): 59-62.
- Padilla P., Angelica A. (2022). Logo: Agave.
- Pal, S., Tak, Y. K. and Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol 73, 1712–1720.
- Pareek, V., Gupta, R. and Panwar J. (2020). Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action: A Review. Materials Science for Energy Technologies.
- Parsons, J. R., and Parsons, A. H. (1990). Maguey Utilization in Highland Central México: An Archaeological Ethnography. University of Michigan. Ann Arbor, Illinois. 388 p
- Pelt-Verkuil, E., Belkum, A. and Hays, J. P. (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification. Springer Science. ISBN 978-1-4020-6240- 7.
- Piontelli L., E. (2015). Especies oportunistas de importancia clínica de los géneros *Bipolaris Shoemaker* y *Curvularia* Boedijn: su caracterización bajo los nuevos criterios taxonómicos. DOI: <http://dx.doi.org/10.12705/626.21>.
- Piontelli L., E. (2015). Opportunistic species of clinical relevance in the *Bipolaris Shoemaker* & *Curvularia* Boedijn genera: its characterization under newest taxonomic criteria. Excátedra de Micología, Escuela de Medicina Universidad de Valparaíso, Casilla 92 V, Valparaíso, Chile. Bol. Micol. 2015; 30(2): 40-63.

- Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L. and Fu, Z. (2013). Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *J. Environ. Sci.* 2013, 25, 1947–1956.
- Ramírez R. M. (2000). Ignacio Torres Adalid y la industria pulquera. Plaza y Valdés Editores. Instituto de Investigaciones Sociales, UNAM. México. 356 p.
- Ramírez-Manzano, Sandra I., Bye, R., García-Moya, E. y Romero-Manzanares, A. (2020). Aprovechamiento del maguey pulquero en Nanacamilpa, Tlaxcala, México. *Revista Etnobiología*. Vol 18, Num. 1. Abril 2020. pp: 65-76.
- Ramos-Zablah, Claudia M. (2004). Métodos de conservación para retardar la fermentación en aguamiel. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, División de Ciencia Animal. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Rangel, S. y R. Galván. (1992). Notas sobre el género *Agave* en el valle del mezquital. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 37: 93-99.
- Rashid M., M. O., Akhter, K. N., Chowdhury, J. A., Hossen, F., Hussain, M. S. and Hossain, M. T. (2017). Characterization of phytoconstituents and evaluation of antimicrobial activity of silver extract nanoparticles synthesized from *Momordica charantia* fruit extract. *BMC Complement. Altern. Med* 17, 336–341.
- Robert, M. L., Herrera, J. L. and Contreras, F. (1992). Micropropagation of *Agave* spp. En: Bajaj, Y.P.S. (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 19. High-Tech and Micropropagation III. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. Pp. 306-329.
- Rocío, José J. y García, M. E. (2000). Remoción cuticular (mixiote) y desarrollo foliar en los *Agaves* pulqueros (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, núm. 66. Pp. 73-79.
- Rodríguez O., A., Equihua-Martínez, A., Llanderal C., C., Rodríguez O., T. L., Pro-Martínez, A., Pino M., J. M., Barrón Y., R. M y García M., J. A. (2017). Infestación de gusano blanco en maguey de cerro (*Agave lechuguilla*).
- Rodríguez-Morales, N. L. (2022). Análisis del efecto de la incorporación de plata en una matriz de hidroxipatita para aplicaciones biomédicas.
- Roldán C. E. I. (2017). La planeación pública regional en Hidalgo. El Colegio del Estado de Hidalgo.
- Roldán, C. E. I. (2015). Organización económica y desarrollo regional del estado de Hidalgo: pasado y presente. El Colegio del estado de Hidalgo.
- Rosenman, K. D., Moss, A. and Kon, S. (1979). Argyria: clinical implications of exposure to silver nitrate and silver oxide. *J Occup Med*; 21: 430–5.
- Russell, A. D., and W. B., H. (1994). Antimicrobial activity and action of silver. *Prog. Med. Chem.* 31:351-370.
- Ruvalcaba-Mercado, J. (1983). El maguey manso. Historia y presente de Epazoyucan, Hidalgo. Primera Edición. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Texcoco, Estado de México. 122 p.
- Safaa M., A., Naeima, M. H. and Nivien Allam., N. (2015). Application of Biosynthesized Silver Nanoparticles for the Control of the Land Snail *Eobania vermiculata* and some phytopathogenic fungi. *Nanomaterials Magazine hindawi publishing corporation*. Volume 2015, Article ID 218904.
- Saji, G., Sijie Lin, Zhaoxia Ji, Courtney R., T. Lin Jiang, L., Mathew Mecklenburg, Huan Meng, Xiang Wang, Haiyuan Zhang, Tian Xia, J. Nathan Hohman, Shuo Lin, Jeffrey I. Zink, Paul S. Weiss and André E. Nel. (2012). Surface Defects on Plate-Shaped Silver Nanoparticles Contribute to Its Hazard Potential in a Fish Gill Cell Line and Zebrafish Embryos.

- Schrezenmeir, J. and M. de Vrese. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics— approaching a definition. *Am J Clin Nutr*, 73: 361–364.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2016). Cierre de la producción agrícola. Anuario Estadístico Nacional de la Producción Agrícola 2016. (http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/).
- SEMARNAT. (2018). Mezcales de Ocotlán: tradición milenaria y éxito de conservación. Conabio impulsa el uso sustentable y la preservación de los agaves.
- SENASICA. (2018). Ficha técnica *Curvularia lunata*. Dirección General de Sanidad Vegetal, Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.
- SENASICA. (2021). Ficha Técnica. Mancha marrón del arroz. *Cochliobolus miyabeanus* (*Bipolaris oryzae*). Dirección General de Sanidad Vegetal Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2018). Maguey pulquero: el estado de Hidalgo destacó en 2017 con 69.6% de la producción nacional.
- Shabana, Y. M., Abdel-Fattah, G. M., Ismail, A. E. and Rashad, Y. M. (2008). Control of Brown spot pathogen of rice (*Bipolaris oryzae*) using some phenolic antioxidants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 438-444.
- Shin Woong, Kim, Yong-Wook Baek and Youn-Joo An. (2011). Assay-dependent effect of silver nanoparticles to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Volume 92, Pages1045–1052.
- Shoemaker, R. A. (1959). Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from *Helminthosporium*. *Canadian Journal of Botany* 37: 879–887.
- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P. and Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 18:1–9.
- Sivanesan, A. (1987). Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers* 158: 1–261.
- Suresh, A. K., Doktycz, Mitchel J., Wei W., Ji-Won Moon, Baohua G., Meyer III, Harry M., Hensley, D. K., Allison, David P., Phelps, Tommy J., and Pelletier, Dale A. (2011). Monodispersed biocompatible silver sulfide nanoparticles: Facile extracellular biosynthesis using the γ -proteobacterium, *Shewanella oneidensis*. Volume 7, Issue 12, December 2011, Pages 4253-4258.
- Tolama S., J.U. (2023). Biosynthesis of copper oxide nanoparticles from *Trichoderma spp.* and its effect against grapevine fungi pathogens. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 43 pp.
- Tripathi, D. K., Tripathi, A., Singh, S., Singh, Y., Vishwakarma, K., Yadav, G., Sharma, S., Singh, V. K., Mishra, R. K. and Upadhyay, R.G. (2017). Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: A concentric review. *Front. Microbiol.*
- TROPICOS. (2022). Missouri Botanical Garden. Disponible en: <https://tropicos.org/Agave/40034234>
- Valenzuela, Z. A. G. (1997). El agave tequilero; su cultivo e industria. Editorial Litteris Segunda Edición, 204 páginas.
- Vásquez V., G. (2006). Aprovechamiento integral del maguey pulquero (*Agave salmiana*) en Santa María Tlahuitoltepec Mixe, Oaxaca. Tesis de Ingeniería en agroecología. Universidad Autónoma Chapingo. México. 103 p.
- Venkata S., K., Y. Subba, R., Susmila A., G., T.N.V.K.V. Prasad, A. Varada, R. and D.V.R. Sai, G. (2013). Simple and rapid biosynthesis of stable silver nanoparticles using dried leaves of

- Catharanthus roseus*. Linn. G. Donn and its antimicrobial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 105:194–198
- Venugopal, B., Luckey, T. D., editors. (1978). Metal toxicity in mammals. In *Chemical toxicology of metals and metalloids*. New York: Academic Press. pp. 32–36.
- Vollath, D. (2013). *Nanomaterials An Introduction to Synthesis, Properties, and Applications*. Second Edition. *Environmental Engineering and Management Journal*, 2008, vol. 7, no 6, p. 865-870.
- Wan, A. T., Conyers, R. A., Coombs, C. J. and Masterton, J. P. (1991). Determination of silver in blood, urine, and tissues of volunteers and burn patients. *Clin Chem*; 37: 1683–7.
- Weir, F. W. (1979). Health hazard from occupational exposure to metallic copper and silver dust. *Am Ind Hyg Assoc J*; 40: 245–7.
- White, T. J., T., Bruns, S., Lee and J. Taylor. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics.
- Winter, K. and Smith J., A. C. (1996). An introduction to crassulacean acid metabolism: biochemical principles and biological diversity. En: Winter K. and Smith J.A.C. Eds. *Crassulacean Acid Metabolism. Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*, pp. 1-13, Springer, Berlín.
- Woo Kim, S., Lamsal, K., Hee Jung, J., Seok Kim, Y., Su Kim, K., and Su Lee, Y. (2011). Application of silver nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species in vitro and the anthracnose disease of pepper in the field.
- Young-Ki, J., H. Kim, B., and Geunhwa Jung. (2009). Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Dis*. 93:1037-1043.
- Zhang, N., Rossman, A. Y., Seifert, K., Bennett, J. W, Cai, G., Cai, L., Hillman, B., Hyde, K. D., Luo, J., Manamgoda, D., Meyer, W., Molnar, T., Schoch, C., Tadych, M., White, JF, Jr. (2013). Impactos del código internacional de nomenclatura para algas, hongos y plantas (Código de Melbourne) en los nombres científicos de plantas hongos patógenos. doi:10.1094/APSFeature-2013-06. Función APS. Sociedad Americana de Fitopatología, St. Paul, MN. Zhao Q., Y., D. M., Zhang, L.-J. Zhang, X. Y. Yu, H. R., Yu, K. Shi, Y. and K, Gao. (2017). First report of brown spot on erusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*) caused by *Bipolaris zeae* in China.
- Zhao Q., Y., D. M., Zhang, L.-J. Zhang, X. Y. Yu, H. R., Yu, K. Shi, Y. and K, Gao. (2017). First report of brown spot on erusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*) caused by *Bipolaris zeae* in China.