

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



Escuela Superior de Apan

TESIS DE LICENCIATURA

“Evaluación de la actividad antifúngica del nitrato de plata contra *Bipolaris zeae*, un hongo aislado de la enfermedad de la mancha negra, o negrilla del maguey, de *Agave salmiana*”

Para obtener el título de
Licenciada en Ingeniería en Biociencias

P R E S E N T A
Issela Granados Zamora (333002)

Director de tesis
Dr. Victor Hugo Pérez España

Codirector de tesis
Dra. Teresa Romero Cortés

Noviembre, 2024



Lugar donde se realizó la tesis

Este trabajo se realizó en las instalaciones de la Escuela Superior de Apan de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del **Dr. Victor Hugo Pérez España** y con la codirección del **Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra**. Esta investigación fue financiada con recursos personales del Dr. Victor Hugo Pérez España.



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Escuela Superior de Apan
Campus Apan

Apan, Hgo., a 11 de noviembre de 2024
Número de control: ESAP-436/2024
Asunto: Autorización de impresión de tesis

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
PRESENTE

Por este medio le comunico que, el jurado asignado a la pasante de la licenciatura en Ingeniería en Biociencias **Issela Granados Zamora** (333002), a quienes les presentó el trabajo para su titulación en la modalidad de tesis con el título **“Evaluación de la actividad antifúngica del nitrato de plata contra *Bipolaris zeae*, un hongo aislado de la enfermedad de la mancha negra, o negrilla del maguey, de *Agave salmiana*”**, después de la revisión ha autorizado la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

PRESIDENTE: Dr. Victor Hugo Pérez España

SECRETARIO: Dra. Teresa Romero Cortes

PRIMER VOCAL: Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra

SEGUNDO VOCAL: Dr. Martín Peralta Gil

TERCER VOCAL: Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros

SUPLENTE 1: Dr. José Esteban Aparicio Burgos

SUPLENTE 2: M. en C. Mónica Ivette Sánchez Contreras

ATENTAMENTE
“Amor, Orden y Progreso”

Dr. Jorge Zuno Silva

Director de la Escuela Superior de Apan



Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa Tlaayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43900
Teléfono: 7717172000 Ext. 5800, 5801
esap@uaeh.edu.mx



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Escuela Superior de Apan
Campus Apan

Asunto: Solicitud de Incorporación de tesis al repositorio institucional

Mtro. Jorge E. Peña Zepeda
Director de Bibliotecas y Centro de Información
Presente.

Por medio del presente hago constar que la tesis en formato digital, titulado **"Evaluación de la actividad antifúngica del nitrato de plata contra *Bipolaris zeae*, un hongo aislado de la enfermedad de la mancha negra, o negrilla del maguey, de *Agave salmiana*"** que presenta **Issela Granados Zamora** con número de cuenta **333002** es la versión final validada por el Comité Tutorial y cumple con el oficio de autorización de impresión, por lo que solicito su integración en el repositorio institucional de tesis.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Apan, Hgo. a 20 de noviembre de 2024

Dra. Teresa Romero Cortes
Coordinador de Ingeniería en Biociencias



Issela Granados Zamora
Autor de tesis



Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia
Chimalpa Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P.
43900
Teléfono: 7717172000 Ext. 5800, 5801
esap@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

Dedicatoria:

A mi madre, a mi padre y a mis hermanas quienes han estado ahí desde el principio de mi historia, abrazando mis comas, entendiendo mis puntos y seguidos y respetando mis puntos finales.

A quienes han podido verme con los ojos del corazón y a los que aun con miedo se arriesgan día con día.

A todos ustedes gracias.

Con cariño, respeto y admiración.

Iss Granados.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a **Dios** por la vida que me dio, por la salud que invade mi cuerpo; por iluminar y guiar mi camino, por haberme puesto en este lugar.

A ti, mi lucero que iluminas todas mis noches, por ser mi cómplice eterna en cada paso que doy y por tomar mi mano en cada momento para caminar por la senda correcta.

A mi padre: †**Palemón Granados J.** † Porque con tu amor e inteligencia ayudaste a construir un camino sólido en la vida de mis hermanas y la mía. Gracias por tu nobleza, tu fortaleza, y sobre todo porque de ti aprendí que todo en esta vida tiene solución y debemos levantarnos más fuertes después de cada caída. Aunque ya no estés, tu alma aún me abraza, tu voz aun la escucho y porque donde sea que te encuentres, siempre te llevo conmigo.

A mi madre: **Yolanda Zamora C.** A ti que eres mi corazón y mi columna vertebral, gracias por ser fuente infinita de amor y sabiduría porque gracias a ello no me rendí. Jamás tendré como pagarte el que dedicaras tu vida a nosotras y actuaras como el combustible de mi motor cuando ya no quedaban fuerzas. Gracias por ser la mujer maravilla que siempre me protege y me ama a pesar de todo.

A mis hermanas: **Zelmha y Maritza.** Gracias por ser mis incondicionales, la pieza clave de mi rompecabezas, por su esfuerzo, su amor, su complicidad y sobre todo por su amistad; sin ustedes llegar hasta donde estoy no hubiese sido posible, agradecida por ayudarme con la construcción de mis alas para iniciar a emprender el vuelo desde que nací, por darme todo lo necesario para construir mi camino profesional y por ser mis personas favoritas.

Dr. Víctor Hugo y Dra. Teresa, a ustedes por apostar por mi proyecto y creer en mí. Gracias por ayudarme a enriquecer mis habilidades prácticas, así como fomentar en mí el gusto por la investigación, por su invaluable apoyo científico, moral y económico. Gracias por ser mi mapa y luz en el sendero de la ciencia. Nunca tendré como pagarles el que me hayan hecho pensar, a ser más crítica y objetiva, pero sobre todo por ver ese algo en mí, que va más allá de un aula y me hayan permitido compartir y aprender de y con ustedes.

Miss Mónica, a usted por impulsarme a siempre ir por más, por no permitirme decir “no puedo” porque aprendí a nunca quedarme con la duda y jamás dejar de intentar. La luz que la caracteriza ha sido guía para muchas personas incluyéndome, nunca se apague, recordaré ser siempre como e^x.

A todo mi comité por aportarme conocimiento en cada una de las clases que me impartieron, por aceptar ser parte de este proyecto, por enseñarme a mejorar como alumna, Ing. y persona. A todos los **docentes** y **personal administrativo** de la **Escuela Superior de Apan** con los que compartí aula, laboratorio, conversaciones y demás momentos, gracias porque con su sabiduría y experiencia le aportaron a mi formación, y a mi persona.

Dr. Pablo Octavio. Gracias por compartirme un poco de su conocimiento y su invaluable apoyo en la elaboración de la estadística de esta tesis.

A mi cuñada, **Areli Zayago** por ser fundamental en este proceso, por tus consejos, tu paciencia y porque eres de las personas en las que más confío.

Betty, Marlon y Eber Con amigos reales y buenos compañeros de clase se logra sacar adelante la universidad, solo nosotros sabemos lo que pasamos; gracias por ser mi equipo alfa dinamita, por su apoyo incondicional y por siempre buscar el bien colectivo. Los llevo en mi corazón.

Ing. Édgar Azael, por ser mi cómplice desde el día que nos conocimos, por ser mi paño de lágrimas, mi real y lealTú sabes, pocas palabras y muchos sentimientos. Dúrame siempre, hermano.

A Viviane, porque en poco tiempo conectamos, y te volviste mi confidente y mi persona. Gracias primorosa por ser y estar.

Víctor Hugo Neri. Gracias por tu amistad, compañía y soporte incondicional. Por el amor que me das, por la calma y serenidad que le ofreces a mi caos interno, por la lealtad que desde que te conozco me has ofrecido, por esa ternura con la que me

miran tus ojos, pero, sobre todo gracias porque en cada paso que doy tu mano me sostiene. Te llevo siempre en mi mente y corazón.

Tía Angela, a usted por ser un rayito de sol que le aporta energía a mi vida, por ser mi amiga y mi guía espiritual. Gracias porque junto con mi **Tío Óscar**, han sido mi segundo hogar, uno de mis lugares favoritos llenos de paz.

Antony y Jair Agradecida con Dios por haberlos puesto en mi vida, porque son los hermanos de sangre que no tengo y sin su apoyo todo hubiese sido más complicado. Gracias por su cariño. A **la Familia Zamora**. Siempre voy a admirar la unión que forman. Gracias a todos por el cariño especial que me tienen.

A las familias de mis amigos que me abrieron las puertas de su casa, que me cuidaron como una hija, que me alimentaron y animaron a continuar, con una mención especial a **la Fam. Neri Trejo y Fam. Alvarado Herrera**.

A todas y cada una de las personas que conocí en este camino con las que entablé un vínculo amistoso, reí y compartí buenos y no tan buenos momentos.

A Elizabeth Ramírez y Paola Dorantes Dos mujeres increíbles que aprecio y admiro, afortunada de coincidir con ustedes.

A **Rocío Ramírez**, por ver mi potencial y alentarme a no conformarme y a ir siempre por más, dé una forma sana, sin tambalear y sin dañar a nadie, porque contigo mis alas se convirtieron en valentía y el cielo dejó de ser mi límite.

A mis mascotas que iniciaron este camino conmigo y no lo terminaron: **Sombra y greñas**, por enseñarme a amar de una forma tan pura, intensa y leal. A mi compañera de desvelos, tristezas, alegrías: **Chompiras** gracias porque tu ronroneo fue mi alivio y mi arrullo por más de una ocasión. **Orejas, Cortinas, Lobo y pambazo** gracias amiguitos por ser felices al verme.

A mi computadora **ACER Aspire 3** por aguantar el ritmo de trabajo de a veces más de 12 h a Word, Excel y PP, por siempre crear un Autoguardado.

RESUMEN

Agave salmiana, o maguey pulquero, es una especie endémica de México de la cual se pueden aprovechar todas las partes de la planta adulta, además, tiene potencial agroeconómico para la región de los Valles altos, que comprende los estados de México, Hidalgo, Tlaxcala y Puebla. Sin embargo, en las últimas décadas la producción ha decrecido debido a una serie de factores externos que ponen en peligro la conservación de la planta. Las principales causas son las enfermedades y plagas. Un claro ejemplo de esto es la enfermedad de “*la negrilla*” o “mancha foliar negra” que presentan los cultivos de *A. salmiana*. Esta enfermedad causa la deshidratación y muerte de las pencas, y en algunos casos de la planta entera.

Trabajos recientes en nuestro grupo de investigación se logró el aislamiento e identificación del hongo *Bipolaris zeae* como posible agente causal de la enfermedad. En este trabajo, se identificó la actividad fungicida del nitrato de plata (AgNO_3) contra *B. zeae*, bajo condiciones de laboratorio en medio de cultivo PDA, en plantas de maíz y *Agave*. Logrando determinar la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de las hifas y de la germinación de los conidios. Se obtuvo una reducción del 80 y 96% en el porcentaje de germinación de conidios, con concentraciones de 100 ppm y 200 ppm respectivamente, así como actividad fungicida en plantas infectadas fue observable a una concentración de 200 ppm. Los resultados de esta investigación muestran que el AgNO_3 podría ser utilizado bajo condiciones de laboratorio y campo para inhibir el crecimiento de este hongo fitopatógeno directamente en plantas.

ABSTRACT.

Agave salmiana, or maguey pulquero, is an endemic species of Mexico from which all parts of the adult plant can be used, in addition, it has a great agroeconomic potential for cultivation areas. However, over the years production has decreased due to a series of external factors that endanger the conservation of the plant. One of the main causes are diseases and pests. A clear example of this is the "negrilla" or "black spot" disease that affects *A. salmiana* crops. This disease causes dehydration and death of the stalks, and in some cases of the entire plant.

Recent work in our work group achieved the isolation and identification of the fungus *B. zeae* as a possible causal agent of the disease. In this work, the fungicidal activity of silver nitrate (AgNO_3) against *B. zeae* was identified, the minimum inhibitory concentration of hyphal growth and conidial germination in PDA medium and, in corn and *Agave* plants was determined. We obtained a reduction of 80 and 96% in the percentage of conidia germination, at concentrations of 100 ppm and, 200 ppm, respectively. The antifungal activity in infected plants was observable at a concentration of 200 ppm. These results show that AgNO_3 could be used to inhibit the growth of this phytopathogenic fungus directly on plants.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABLAS.....	XII
1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 GENERALIDADES DEL MAGUEY PULQUERO	1
1.2 DATOS DE DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	1
1.3 DATOS BIOLÓGICOS Y TAXONÓMICOS	2
1.4 APROVECHAMIENTO DEL MAGUEY EN MÉXICO.....	3
1.4.1 <i>Relevancia económica del maguey</i>	<i>3</i>
1.4.2 <i>Usos de la hoja (penca) y cutícula del maguey.....</i>	<i>4</i>
1.4.3 <i>Piña o mezontete.....</i>	<i>5</i>
1.4.5 <i>Inflorescencia y quiotes.....</i>	<i>7</i>
1.4.6 <i>Plagas.....</i>	<i>7</i>
1.5 IMPORTANCIA ECOLÓGICA DEL MAGUEY PULQUERO.....	8
1.6 IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA DEL MAGUEY.....	8
1.7. IMPORTANCIA DEL MAÍZ EN MÉXICO.....	9
1.8 ENFERMEDADES O PLAGAS QUE PONEN EN PELIGRO LA CONSERVACIÓN DEL MAGUEY.....	10
1.8.1 <i>“Negrilla” o “viruela”.....</i>	<i>11</i>
1.8.2 <i>Asterina mexicana</i>	<i>11</i>
1.8.3 <i>Curvularia Lunata.....</i>	<i>11</i>
1.8.4 <i>Bipolaris zeae.....</i>	<i>12</i>
1.9 ENFERMEDADES QUE PONEN EN PELIGRO LOS CULTIVOS DE MAÍZ BLANCO Y AMARILLO.....	13
1.9.1 <i>C. lunata.....</i>	<i>13</i>
1.9.2 <i>Bipolaris spp.....</i>	<i>14</i>
1.10 BIOTECNOLOGÍAS INNOVADORAS EN LA AGRICULTURA	15
1.10.1 <i>Biosíntesis de nanopartículas de plata.....</i>	<i>15</i>
1.10.2 <i>Biosíntesis de Nanopartículas de plata utilizando bacterias.....</i>	<i>16</i>
1.10.3 <i>Mecanismo de acción de nitrato de plata (AgNO₃).....</i>	<i>16</i>
1.11. TOXICIDAD DE LA PLATA.....	20
1.11.1 <i>Toxicidad en plantas</i>	<i>20</i>
2. ANTECEDENTES	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVOS	25
5.1 <i>Objetivo general.....</i>	<i>25</i>
5.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>25</i>
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1 SÍNTESIS EXTRACELULAR DE BIONANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	26
6.1.1 <i>Obtención de sobrenadante de Leuconostoc mesenteroides.....</i>	<i>26</i>
6.1.2 <i>Reacción de síntesis con AgNO₃.....</i>	<i>26</i>
6.1.3 <i>Caracterización óptica de las nanopartículas biosintetizadas.....</i>	<i>27</i>
6.1.4 <i>Caracterización en SEM de las nanopartículas biosintetizadas</i>	<i>27</i>
6.2 RECOLECCIÓN Y CONTEO DE CONIDIOS.....	27
6.2.1 <i>Preparación de inóculo.....</i>	<i>27</i>
6.2.2 <i>Obtención de conidios.....</i>	<i>27</i>
6.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA BSAGNPS Y EL AgNO₃ EN B. ZEAЕ.....	28
6.3.1 <i>Germinación en cámara húmeda y preparación de muestras.....</i>	<i>28</i>

6.3.2 Pruebas estadísticas.....	30
6.4 EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DEL AgNO_3 CONTRA <i>B. ZEA</i>E. EN MEDIO DE CULTIVO.....	31
6.4.1 Crecimiento radial.....	31
6.5 EVALUACIÓN DE POSIBLES EFECTOS TÓXICOS CAUSADOS POR LAS SOLUCIONES DE NITRATO DE PLATA EN LAS PLÁNTULAS DE <i>Z. MAYS</i>.....	32
6.5.1 Diseño experimental.....	32
6.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS TRATAMIENTOS A BASE DE NITRATO DE PLATA CONTRA EL FITOPATÓGENO <i>B. ZEA</i>E IN PLANTA DE <i>Z. MAYS</i> Y <i>A. SALMIANA</i>.....	33
6.6.1 Diseño experimental del tratamiento preventivo:.....	33
6.6.2 Diseño experimental del tratamiento correctivo.....	34
6.6.3 Evaluación de la actividad antifúngica correctiva del AgNO_3 en hojas de <i>A. salmiana</i> infectadas.....	35
6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	35
7. RESULTADOS.....	37
7.1 BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	37
7.3 CARACTERIZACIÓN EN SEM DE LAS NANOPARTÍCULAS BIOSINTETIZADAS.....	39
7.4 EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE LAS BIONANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	40
7.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL AgNO_3	43
7.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL AgNO_3 , CRECIMIENTO RADIAL EN PLACAS PETRI.....	46
7.7 EVALUACIÓN DE EFECTOS TÓXICOS DEL NITRATO DE PLATA EN PLÁNTULAS DE <i>Z. MAYS</i>	47
7.7.1 Crecimiento del tallo.....	47
7.7.2 Brotes de hojas y hojas secas.....	48
7.8 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL NITRATO DE PLATA CONTRA LA INFECCIÓN DE <i>B. ZEA</i> E.....	50
7.8.1 Tratamiento preventivo in planta de <i>Z. mays</i>	50
7.8.2 Tratamiento correctivo in planta de <i>Z. mays</i>	53
8. CONCLUSIONES.....	58
9. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO.....	60
10. REFERENCIAS.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zonas de cultivo de <i>A. salmiana</i> <i>A. mapisaga</i> , Altiplano central mexicano.	2
Figura 2. Partes de aprovechamiento del <i>A. salmiana</i>	4
Figura 3. Agave salmiana infectado por la neegrilla	11
Figura 4. Mecanismo de acción del nitrato de plata.....	18
Figura 5. Posible mecanismo de acción de las Nanopartículas sintetizadas.....	20
Figura 6. Técnica de medición de crecimiento radial.....	31
Figura 7. <i>Diseño experimental de la evaluación de posibles efectos nocivos del AgNO₃ in planta</i>	32
Figura 8. Diseño experimental de aplicación de tratamientos Tratamiento preventivo.....	33
Figura 9. Diseño experimental de aplicación de tratamientos tratamiento correctivo.....	34
Figura 10. Biofabricación de bsAgNPs.....	37
Figura 11. Lectura de absorbancias Espectro UV-vis durante la biosíntesis de nanopartículas de plata.	38
Figura 12. Lectura de absorbancias Espectro UV-vis durante la síntesis de nanopartículas de plata.	39
Figura 13. Caracterización y composición de las bsAgNPs a 0.1 M.....	40
Figura 14. Evaluación de la actividad antifúngica de las bsAgNPs 0.1 M.....	41
Figura 15. Evaluación de la actividad antifúngica de las bsAgNP 0.06 M.	43
Figura 16. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) del AgNO ₃ a 72h.....	45
Figura 17. Velocidad de crecimiento radial del fitopatógeno <i>B. zeae</i> en placas petri.....	47
Figura 18. Evaluación del crecimiento de las plántulas asperjadas con soluciones de nitrato de plata a 100 ppm y 200 ppm	48
Figura 19. Infección por <i>B. zeae</i>	49
Figura 20. Evaluación de los brotes o pérdida de hojas en las plántulas asperjadas con nitrato de plata a 100 ppm y 200ppm.	49
Figura 21. <i>Evaluación del crecimiento de las plántulas en el tratamiento preventivo</i>	51
Figura 22. Evaluación de los brotes o pérdidas de hojas en las plántulas del tratamiento preventivo. ...	52
Figura 23. Tratamiento preventivo en plántulas de <i>Z. mays</i>	52
Figura 24. Evaluación del crecimiento de las plántulas en tratamiento correctivo.....	53
Figura 25. Evaluación de los brotes o pérdidas de las hojas en plantúlas del tratamiento correctivo.....	52
Figura 26. Tratamiento correctivo en plántulas de <i>Z. mays</i>	54
Figura 27. Evaluación antifúngica correctiva del AgNO ₃ en <i>A. salmiana</i> infectado. ... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 28. Evaluación de la actividad antifúngica correctiva del AgNO ₃ en planta de <i>A. salmiana</i> infectada.....	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Diseño experimental para la evaluación de actividad antifúngica de las bsAgNPs a 0.1M	29
Tabla 2. Diseño experimental para la evaluación antifúngica de las bsAgNPs a 0.06 M	29
Tabla 3 Determinación de las MIC de AgNO ₃	30
Tabla 4 Diseño experimental de la evaluación antifúngica del AgNO ₃ con las concentraciones seleccionadas.	30
Tabla 5. Lectura de absorbancias en el espectrofotómetro UV-vis a 420 nm.....	37

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del maguey pulquero

La palabra “maguey” es de origen precolombino; en lengua náhuatl se le llama *metl*, un nombre vinculado con la voz *mayauetl* o *mayahuel*, nombre de la diosa femenina asociada a esta planta. Carlos Lineo quien fue naturalista sueco, en el siglo XVIII nombró a los magueyes “*Agave*” o “*Agaváceas*”, porque los encontró ilustres y admirables; el cual corresponde a ese significado de *Agave* en la voz grecolatina *agavus* (Becerril, 2015). En la actualidad, la mayoría de las palabras para la planta, partes de ella y algunos utensilios que emplean en el proceso de capado, raspado y elaboración del pulque derivan en su mayoría del náhuatl como: maguey (*metl*), quiote (*quiyotl* -tallo de la planta), mixiote (*xiotl*-cutícula), meyolote (*yolotl*-corazón), pulque (*polihuque* - descompuesto), entre otros términos (Erlwein *et al.*, 2013).

1.2 Datos de distribución geográfica.

El género *Agave* ha estado ligado a los habitantes de Mesoamérica y Aridoamérica desde hace unos 10,000 años (Granados, 1993). Actualmente, de las casi 200 especies de maguey que hay a nivel mundial, alrededor del 80% se encuentran en México, país considerado el centro de origen del género (Granados, 1993; Torres *et al.*, 2015; CONABIO, 2016).

La domesticación de los *Agaves* inició hace más de 3,500 años por las culturas de Tula, Tulancingo y Teotihuacan. El área denominada como Altiplanicie central, o “los valles altos”, es actualmente la más propicia para el cultivo de *A. salmiana*, esta área comprende planicies altas de aproximadamente 2,200 a 2,700 msnm, y abarca los estados de Tlaxcala, Puebla, Hidalgo, Estado de México y Ciudad de México (Figura 1). Una de sus principales características es que es una zona semiárida con lluvias en verano, con clima más frío que templado, en donde las heladas son comunes en otoño e invierno (Granados, 1993; Lorenzo,2007).



Figura 1. Zonas de cultivo de *A. salmiana*/ *A. mapisaga*, Altiplano central mexicano.

1.3 Datos biológicos y taxonómicos

Los magueyes pertenecen al orden *Asparagales*, familia *Asparagaceae* antes (*Agavaceae*) subfamilia *Agavoidea* y al género *Agave*. *A. salmiana* se caracteriza por tardar entre 8 y 12 años para florecer. La planta se compone de ocho partes fundamentales: la raíz, el tallo o piña, hojas o pencas, espinas o púas, quiote, hijuelos vegetativos flor y semilla. Los magueyes de la zona de los llanos de Apan se caracterizan por ser plantas con tallo grueso y corto; con pencas dispuestas en espiral de color verde mate, carnosas, rígidas, lanceoladas espatuladas u ovadas, con espinas laterales triangulares y ápice con una espina terminal recta y rígida; de uno a dos metros de longitud y hasta 0.4 m de ancho, el margen en ocasiones con mamilas, dentadas, denticuladas suculentas o fibrosas (García, 2011).

El pedúnculo floral es de 6 a 10 m de longitud, cubierto de brácteas triangulares; la inflorescencia (quiote) es semileñosa, bracteada y bracteolada (García, 2011). Su reproducción es sexual y asexual, son monocárpicas, es decir que fructifican una vez en su vida y mueren al terminar la floración.

1.4 Aprovechamiento del maguey en México.

1.4.1 Relevancia económica del maguey

El uso del maguey está vinculado con la población mesoamericana hace aproximadamente 10 mil años (Mora *et al.*, 2011). Esta planta fue denominada “el árbol de las maravillas” por José Acosta en el año 1590 debido a que desde épocas antiguas el maguey ha sido usado de diversas maneras. Por ejemplo, la obtención de aguamiel, pulque, jarabe, fructosa, forraje, vinagre, fibras para elaborar vestimentas, calzado, papel, jabón, púas, ungüentos, el implemento de las pencas para la barbacoa de horno e incluso para la producción de algunas plagas larvarias como: chinicuil, y gusano blanco mismas que están asociadas al maguey debido a que actúa como su hospedador (Becerra, 1988; Luna, 2009; Ramírez, 2010). En la Figura 2, se muestra un diagrama de cada una de las partes de la planta del maguey que son aprovechadas por los productores de *Agave* en México.

El maguey pulquero representa un recurso de suma importancia económica, cultural y nutricional para los habitantes de México, desde la época prehispánica (Hernández, 1979). El principal producto derivado de esta planta es el pulque, bebida alcohólica de color blanquecino de textura viscosa, sabor ligeramente ácido y con una graduación alcohólica baja entre 4-7° GL; Esta bebida fermentada es resultado de la sabia fresca conocida como “aguamiel” extraída de la base del tallo de la planta (Escalante, *et al.*, 2016). En México, los datos estadísticos referentes a superficies plantadas de maguey pulquero, la producción anual de pulque y comercialización nacional e internacional, además, de los precios, son inexactos y dispersos lo que obstaculiza la visión del panorama general de la situación actual del cultivo y aprovechamiento de los recursos derivados del maguey pulquero en la región de los Valles Altos (Álvarez-Duarte *et al.*, 2018).

En los estados de Puebla y Tlaxcala, se encontraron con más de 10 formas de aprovechamiento de los magueyes, de las cuales las más sobresalientes debido a la frecuencia con la que lo realizan los productores son la extracción de aguamiel para

la elaboración de pulque con un 44.6%, el cultivo de maguey para la cosecha de pencas para la preparación de barbacoa con el 38.4% y la obtención de gusanos comestibles con un 17% (Álvarez Duarte *et al.*, 2018).

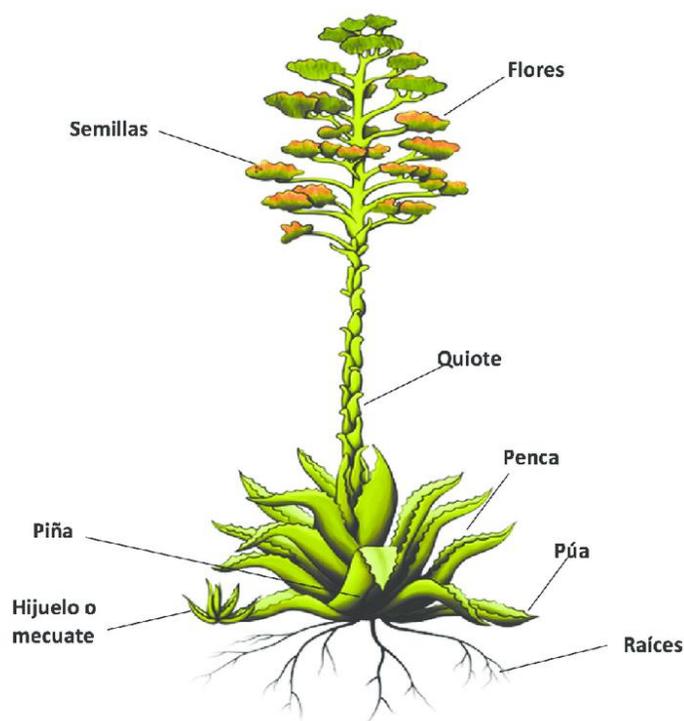


Figura 2. Partes de aprovechamiento del *A. salmiana*. (AME 57. El Maguey - Editorial Raíces Digital, s. f.)

1.4.2 Usos de la hoja (penca) y cutícula del maguey

Un alimento bastante representativo en la gastronomía mexicana es el mixiote, platillo preparado y cocinado envuelto, el cual se obtiene al extraer la cutícula de las pencas del *Agave*, obtenida de las pencas jóvenes, es un material que funciona como un polímero de color transparente (SIAP, 2017). La obtención de la cutícula en la última década ha provocado una explotación masiva, clandestina e irracional de esta especie lo que genera que el meyolote se seque propiciando la muerte del maguey actividad que ocasiona pérdidas económicas considerables a los productores de maguey. (Erlwein *et al.*, 2013).

Las pencas tienen una gran diversidad de usos, dependiendo de las necesidades y costumbres que se tengan en la región que se encuentren. Uno de los principales aprovechamientos en el estado de Hidalgo es para la elaboración de barbacoa, platillo mexicano cocinado con carne bovina, ovina o caprina en hornos de leña bajo tierra. Para evitar que la carne tenga contacto con la tierra, se utilizan las pencas bajas y más viejas de la planta de maguey pulquero las cuales funcionarían como envoltura.

Este producto alcanza precios de entre 10 y 15 pesos por hoja en el estado de Hidalgo, en el Estado de México puede adquirirse en 25 pesos y en la Ciudad de México puede llegar a superar los 30 pesos (Cruz Vasconcelos, 2019). En 2013, la demanda de pencas para barbacoa se estimó en 6.8 millones de pesos solo en el estado de Hidalgo, para 2020 se estimaba que el precio alcanza más de 8.5 millones, para los cuales se necesitan 2.9 millones de plantas maduras (Madrigal *et al.*, 2014).

Uno de los usos aún más antiguos de las hojas del maguey es la elaboración de utensilios como platos o vasos (xoma) (Cruz-Vasconcelos, 2019). Anteriormente, se usaban también en la construcción de techos y paredes, ya que guardan bastante calor, debido a su forma acanalada en las temporadas de lluvias evitan que las casas se llenen de humedad, además, se utilizaban como canales para recolectar el agua de lluvia; en algunos lugares también se colocaban a modo de cerca. Por otro lado, la obtención del ixtle también deriva de las pencas, estas fibras son utilizadas para la fabricación de costales, bolsas, telas, mantas tapetes, ayates, herramientas de usos cotidiano como sogas, reatas, canastas, cepillos, petates o cuerdas para instrumentos musicales resultado de la gran resistencia que presentan las fibras al estar totalmente secas (Vázquez-García *et al.*, 2016).

1.4.3 Piña o mezontete

Dentro de los principales aprovechamientos del *mezontete* o piña del maguey está la extracción del aguamiel, y después de su fermentación la obtención del pulque, bebida que se obtiene posteriormente al raspado del mezontete así como también la

obtención de un jarabe que se usa como remedio natural para los malestares de tos o dolor de garganta, obteniéndose después de cocinar el aguamiel a fuego medio. Igualmente se puede obtener vinagre o. De igual forma después de secarse puede ser utilizado como recipiente o al destrozarlo como alimento para ganado (Medina, 2022).

Del náhuatl *octli* el pulque es la bebida alcohólica de origen prehispánico que se obtiene producto de la fermentación del mucílago de las pencas que se extrae de las plantas de *A. salmiana*. Hace varios cientos de años era una bebida que se reservaba a las clases altas de la antigua sociedad azteca, quienes lo usaban en rituales y festejos que realizaban en honor a Mayahuel, la diosa del maguey (De Agricultura y Desarrollo Rural, 2015).

El pulque es tan famoso que se consume en toda la República Mexicana, junto al tequila y mezcal es una de las bebidas de mayor tradición en México también llamado néctar de los dioses. Las entidades que destacan tanto en producción como en consumo son: Ciudad de México, Estado de México, Hidalgo, Tlaxcala, Morelos y Michoacán (De Agricultura Y Desarrollo Rural, 2015).

La savia colectada comienza a fermentar “espontáneamente” debido al metabolismo de microorganismos asociados a los agaves o que son incorporados al momento de la colecta, como bacterias ácido-lácticas de los géneros *Lactobacillus* o *Leuconostoc* y levaduras como *Saccharomyces* (Escalante *et al.*, 2016).

Al pulque, tradicionalmente, se le atribuyen propiedades medicinales, tales como que alivia trastornos gastrointestinales, estimula el apetito, combate la debilidad y mejora ciertos padecimientos renales, también recomiendan su consumo a las mujeres en etapa de lactancia para aumentar la secreción de leche y mejorar su calidad (De Agricultura Y Desarrollo Rural, 2015).

1.4.5 Inflorescencia y quiotes.

Las flores del maguey también conocidas como quiotes son la base de algunos platillos de la gastronomía mexicana como los gualumbos y el dulce de quiote mayormente consumido por las familias campesinas. En algunas regiones aún se utiliza el quiote maduro en conjunto con las pencas para la construcción de viviendas o delimitación de terrenos como cerca o también con artesanías (Narváez-Suárez *et al.* 2016).

1.4.6 Plagas

En México la entomofagia tiene lugar desde la época prehispánica, donde los indígenas conformaban su alimentación con gusanos o insectos, aún en la actualidad la dieta basada en el consumo de estos animales sigue prevaleciendo principalmente en zonas rurales. Dónde la venta de estos platillos en mercados locales, fondas y restaurantes es a precios excesivos debido a que es un comercio bastante demandado ya que se consideran comida gourmet (Cruz-Vasconcelos, 2019).

Algunas plagas larvarias consumibles para el ser humano relacionadas a los magueyes pulqueros son: gusano blanco de maguey (*Acentrocneme hesperiaris*), los cuales son larvas de una mariposa que se localiza dentro de la penca del maguey, está asociado al *A. salmiana*, *A. mapisaga*, *A. tequilana* (Vargas-Zúñiga *et al.*, 2018).

El gusano rojo de maguey mejor conocido como chinicuil es la larva de la palomilla (*Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt) una plaga que se alimenta de los tejidos de las diferentes partes del maguey, el cual le sirve como hospedero hasta que completa su ciclo de vida aproximado en un año (Vargas-Zúñiga *et al.*, 2018).

El comercio de los insectos alcanza su máximo entre los meses de mayo y junio en el que un productor puede recolectar aproximadamente 3 litros de gusanos por un precio mayor a los 3 mil pesos considerando que el precio por litro sería de mil 200 pesos por litro (Cruz-Vasconcelos, 2019). Es por ello que, durante la búsqueda y

recolección de estos, se trata de dañar lo menor posible a la planta, sin embargo, el comercio clandestino al momento de extraerlos no tiene la precaución necesaria cortando por completo la penca y lastimando las raíces generando un daño irreversible al mezontete que al final ocasiona la muerte al maguey dañado.

1.5 Importancia ecológica del maguey pulquero.

El maguey es sumamente eficiente para conservar el suelo agrícola, ya que es un cultivo que mantiene los nutrientes del suelo y evita la pérdida de los mismos por la erosión. En otra instancia la planta es una herramienta eficiente para el control de lluvia, ya que retiene humedad que es aprovechada para los cultivos adyacentes a ella, así como también la alternativa de crear barreras vivas con esta especie ya que es capaz de crear un microclima que favorece la retención de la humedad en el suelo además, de alejar fauna nociva y proteger de los fuertes vientos los cultivos. (Narváez-Suárez *et al.* 2016).

La conservación de la biodiversidad también forma parte de los beneficios del maguey pulquero ya que atrae abejas, colibríes, avispas, y murciélagos, estos animales desempeñan un destacado papel en la polinización (Narváez Suárez *et al.*, 2016).

1.6 Importancia biotecnológica del maguey.

El maguey puede tener otros usos si se aplica adecuadamente la biotecnología, en medida de que pasa el tiempo y se realizan más investigaciones se han ido descubriendo cada vez más productos que pueden tener otras implementaciones, así como el carbón activado; dentro de estos igual destaca el pulque envasado que ya es exportado a Estados Unidos y algunos países centroamericanos. Así como fibras de consumo humano tal es el caso de la inulina, la obtención de prebióticos y probióticos, la obtención de bioetanol, saborizantes y demás productos de interés industrial (Narváez Suárez *et al.*, 2016).

1.7. Importancia del maíz en México.

El consumo del maíz *Zea mays ssp mays* como principal alimento de los pueblos de México y Mesoamérica nace desde la sedentarización de esa población, hace unos ocho mil años y ha sido la base de su supervivencia y reproducción. Los más antiguos vestigios del maíz fueron localizados en el Balsas río que pasa por los estados de Guerrero y Michoacán desembocando en el océano pacífico, y en los valles de Oaxaca y Tehuacán, Pue., México (Padilla Y Ortega, 2020).

En la actualidad el maíz es uno de los cereales más importantes mundialmente ya que suministra nutrientes a los seres humanos, a los animales y además, funciona como materia prima básica de la industria. Su producción comercial se divide en blanco y amarillo, el maíz blanco se destina principalmente al consumo humano, mientras que la producción de maíz amarillo se destina a la industria o la fabricación de alimentos balanceados para la producción pecuaria. Para Hispano América se han descrito cerca de 220 razas de maíz (Goodman y McK, 1977), de las cuales 64 (29%) han sido identificadas, su mayoría descritas para México (Anderson 1946; Sánchez, 1989; Sánchez *et al.*, 2000). De las 64 razas que se reportan para México, 59 se pueden considerar nativas y 5 fueron descritas inicialmente en otras regiones (Cubano Amarillo, del Caribe, y cuatro razas de Guatemala; Nal Tel de Altura, Serrano. Se han registrado 59 variedades criollas de maíz en México (CONABIO, 2022). México ocupa el 8° lugar en producción mundial de maíz,

De acuerdo a lo reportado por Grupo Consultor de Mercados Agrícolas (GCMA), se estimó que para el año 2023 la producción de granos y oleaginosos estuvo en un rango de 39 a 44.3 millones de t con una producción puntual de 42 millones. En la cual se proyectó que dicha producción se obtendría de la siembra de 11.5 millones de hectáreas (h).

La producción de maíz se calculó en 28 millones de t, teniendo un incremento aproximadamente de 4.2% considerando las 26.9 millones de toneladas cosechadas en el 2022. El rango establecido en el 2023 se consideró variable de 27 a 29 millones,

debido a las condiciones agroclimáticas que se presentaron. En tanto, el rendimiento de maíz se mantuvo en 4 t/h sobre una superficie cosechada que osciló entre 6.4 a 7.4 millones de hectáreas.

Con base en los Datos proporcionados por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2020), revelan que durante el periodo 2010 a 2020 se sembraron en promedio 9.9 millones de hectáreas de granos básicos en México (maíz, frijol, trigo y arroz), de los cuales el maíz representa el 76% del total, con un rendimiento promedio de 3.5 t/ha, dando como resultado una producción de maíz de 26.3 millones de toneladas, de los cuales el maíz blanco participa con el 82.9%, el amarillo con 10.3% y otros tipos de maíz con el 6.8% del total de la producción (Santiago *et al.*, 2022).

El maíz (*Z. mays*) es uno de los cultivos más diversos y con gran adaptabilidad a una amplia gama de zonas agroclimáticas. Es el tercer cereal más cultivado después del trigo y el arroz, se le conoce mundialmente como la "reina de los cereales" debido a su importante potencial de rendimiento genético entre los cereales y se cultiva en aproximadamente 150 millones de hectáreas en unos 160 países con una amplia propiedades del suelo, clima, biodiversidad y prácticas de gestión (Manzar *et al.*, 2022).

1.8 Enfermedades o plagas que ponen en peligro la conservación del maguey.

En los últimos años el cultivo del maguey se ha visto afectado por enfermedades ocasionadas por hongos patógenos y plagas, causando daños severos a nivel cultivo, producción y económico; por lo que la planta no puede ser utilizada y se recurre a su eliminación (SENASICA, 2017). Las principales plagas y enfermedades que atacan los cultivos de maguey en el estado de Hidalgo son el picudo del agave (Cuervo-Parra *et al.*, 2019), y la viruela o negrilla (Pérez España *et al.*, 2022).

1.8.1 “Negrilla” o “viruela”

La viruela, o negrilla, es una enfermedad que afecta las pencas del maguey, genera manchas foliares de color negro. Algunos reportes indican que el daño es causado por un hongo llamado *Asterina mexicana*. Usualmente afecta a las pencas inferiores y cuando la enfermedad está avanzada puede llegar a matar la planta (Pérez *et al.*, 2017).

La Figura 3 muestra una planta de *A. salmiana* afectada por la enfermedad de la negrilla, en la cual se presenta el desarrollo de la infección en la totalidad de la planta y acercamientos de los estragos causados por dicho fitopatógeno



Figura 3. *A. salmiana* infectado por la negrilla A) Efectos de la infección en su totalidad. B) Penca de maguey infectada. C) Acercamiento macro de la mancha negra

1.8.2 *Asterina mexicana*

El hongo *Asterina mexicana* es de clase *Ascomycetes*, orden *Mycophyrates*, familia *Mycrotheriaceae*, su propagación puede ser mediante el viento, agua y pequeños insectos (CESAVEG, 2008). Al ser este un hongo biotrófico crece de manera directa en los tejidos de las plantas, las cuales se manifiestan como manchas en toda la hoja o parte de ella (Hernández *et al.*, 2022).

1.8.3 *Curvularia Lunata*

Cochliobolus, *Bipolaris* y *Curvularia* integran un complejo de especies taxonómicamente confuso, debido a los constantes cambios en la nomenclatura de algunos de sus integrantes asexuales (*Bipolaris* y *Curvularia*), los cuales se han diferenciado principalmente en base a la morfología de sus conidios, situación a veces muy difícil debido a que en ambos géneros algunas especies presentan similares características conidiales (Piontelli Laforet, 2015).

El género *Curvularia* incluye más de 80 especies, de las cuales la mayoría se encuentran en la tierra, plantas y materia orgánica. Su distribución es mundial, pero se ha reportado principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Bay *et al.*, 2017).

Este hongo es responsable de varias enfermedades en las plantas, especialmente a las que pertenecen a la familia *Poaceae*, pero en la actualidad con los cambios ecológicos, los efectos que produce dicho hongo se ven en otras plantas, como en este caso el maguey, ya que prevalece en ambientes húmedos y cálidos, además, de causar daños a los cultivos de manera significativa, impidiendo la fotosíntesis adecuada, debido al aumento del número de lesiones, que pueden determinar la necrosis de toda la hoja. La necrosis y muerte prematura de las hojas limita la intersección de la radiación solar (Hernández *et al.*, 2022; Garcés *et al.*, 2011).

En los análisis macroscópicos y microscópicos realizados de las cepas aisladas de las manchas de *viruela* o *negrilla* en hojas de *A. salmiana* y *Agave lechuguilla* los resultados obtenidos son correspondientes a las del género *Curvularia*, por otro lado, al realizar una identificación molecular exhaustiva se determina y puntualiza la presencia de la cepa *C. lunata* y *C. verruculosa* (Cuervo-Parra., *et al* 2023); Es por ello que se descarta al hongo *A. mexicana* como el agente causal de dicha enfermedad,

1.8.4 *Bipolaris zeae*.

Por otro lado, la presencia de hongos patógenos del género *Bipolaris* en plantas de *A. salmiana* es reciente. En este sentido, en una plantación de maguey pulquero, ubicada en el municipio de Apan, Hidalgo, Romero-Cortes *et al.* (2022) reportan el aislamiento de una cepa de *B. zeae* que muestra la sintomatología típica de las manchas foliares reportadas para la enfermedad coloquialmente conocida como “*negrilla*”. En otro trabajo, realizado en poblaciones silvestres de *A. salmiana ssp. ferox*, ubicado en el municipio de Mineral de la Reforma, Hidalgo, Cuervo-Parra *et al.* (2023), reportan el aislamiento de otra cepa de *B. zeae* que mostró la misma sintomatología de la enfermedad de las manchas foliares en las pencas de los magueyes muestreados.

1.9 Enfermedades que ponen en peligro los cultivos de maíz blanco y amarillo.

A nivel mundial, el maíz se ve afectado por 112 enfermedades. Se han estimado pérdidas de rendimiento mundial del maíz de hasta el 9% debido a enfermedades fúngicas, bacterianas y nematodos. Las enfermedades graves del maíz se extienden a lo largo de un amplio espectro de enfermedades e incluyen *mildiú*, *roya*, *tizón* de las hojas y pudrición del tallo. Estas enfermedades también incluyen el tizón foliar de maydis (MLB), una de las enfermedades más devastadoras que se ha convertido en un problema económicamente significativo (Kumar *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2018; Malik *et al.*, 2018; Revilla *et al.*, 2021)

1.9.1 *C. lunata*

En todo el mundo, las especies del género *Curvularia* y *Bipolaris* ocasionan enfermedades de manchas foliares en cultivos como el arroz, maíz, sorgo, trigo y cebada, lo que provoca graves pérdidas en el rendimiento de los cereales (Manzar *et al.*, 2022).

En este sentido el hongo fitopatógeno *C. lunata*, ocasiona lesiones en las hojas, flores, tallos y semillas de cultivo como el cacao, piñón y chile habanero causando síntomas que van desde manchas foliares pequeñas hasta lesiones de un tamaño

mayor (Hernández *et al.*, 2022). También ha sido reportado como el principal agente causal de la mancha foliar en maíz (Zhang *et al.*, 2019) y el *A. salmiana*, considerando a este último un hospedador inusual de este hongo.

1.9.2 *Bipolaris* spp.

El género *Bipolaris* pertenece a *Ascomycota* de clase: *Dothideomycetes*, de orden: *Pleosporales*, familia *Pleosporáceas*. Su morfología sexual, es del género *Cochliobolus* tipificado por *C. heterostrophus*, ahora está vinculado con la especie tipo de *Bipolaris*, *B. maydis* (Rossmann *et al.*, 2013).

Las plantas que mayormente se ven afectadas por enfermedades causadas por hongos del género *Bipolaris*, son los cereales como: el maíz, arroz, trigo, cebada, sorgo entre otras plantas hospedadoras. La baja en el porcentaje de rendimiento se les atribuye a enfermedades que se asocian con la destrucción de tejidos fotosintéticos, limitando la intercepción de la radiación solar y la producción de foto asimilados para el llenado de granos. La hoja de la espiga y aquellas que se encuentran por debajo y encima de la misma pueden representar el 33% y 40% del área total de la planta. Así, una destrucción de 25% del área foliar del maíz en su porción terminal, próxima a la floración, puede reducir 32% la producción (Fleitas y Grabowski, 2014).

Abarca patógenos que infectan plantas de distribución mundial, la infección por estas especies se identifica comúnmente como manchas foliares, tizones foliares, pudrición de la raíz y otros síntomas de enfermedad principalmente en las zonas altas (Sivanesan, 1987). *Bipolaris oryzae* fue la especie protagonista que provocó una infección devastadora en los cultivos de arroz y trigo causando hambruna en India en 1943 (Sandoval-Martínez, 2022).. Por otra parte, *Bipolaris maydis* fue la principal causa para que, en 1970, Estados Unidos y el Reino Unido tuviera pérdidas

irremediables en los cultivos de maíz (Manamgoda *et al.*, 2012; Manamgoda *et al.*, 2014).

La mancha foliar causada por el complejo de hongos *Bipolaris sp.*, *Curvularia sp.*, *Drechslera sp.* y *Exserohilum turcicum* (Sin: *Helminthosporium turcicum*) (Cardona y González 2006), puede determinar una reducción entre 18 y 50% de rendimiento de granos en función del estado fenológico del cultivo, las condiciones climáticas, presencia del inóculo en el área y la susceptibilidad del material (CIMMYT, 2004). Pese a que la estrategia de control contra estos hongos patógenos es mediante la aplicación de fungicidas químicos, no se dispone de productos eficientes e indicados para el combate de las diferentes enfermedades ocasionadas por este complejo de hongos (Fleitas y Grabowski, 2014).

Al identificar la especie *B. zea*, se buscaron alternativas para disminuir el impacto de la infección o eliminarla por completo, una de las principales técnicas fue la utilización de nanopartículas de plata, bio nanopartículas de plata y tratamientos hechos a bases de Nitrato de plata a bajas concentraciones para inhibir el crecimiento.

1.10 Biotecnologías innovadoras en la agricultura

1.10.1 Biosíntesis de nanopartículas de plata.

La producción agrícola en la última década ha ido en aumento con respecto a la cantidad de amenazas inducidas por diversas especies de patógenos vegetales que, provocan pérdidas económicas irremediables en cultivos de suma importancia. Este contexto ha dado lugar a la aplicación inmensurable de bactericidas o plaguicidas para el control de las infecciones agrícolas, ocasionando problemas de resistencia, afectación del medio ambiente y graves complicaciones a la salud humana, además, de elevar los costos de producción (Rojas-Avelizapa *et al.*, 2020).

En consecuencia, se están introduciendo tecnologías innovadoras en la agricultura moderna para disminuir el porcentaje de merma. Dado a ello la

nanotecnología y la química con grandes avances han proporcionado una técnica más viable conocida como síntesis verde de nanopartículas de plata, ya que da lugar a algunas brechas de investigación y aplicación de antifúngicos agrícolas que su principal objetivo sería controlar las enfermedades de las plantas con un enfoque menos agresivo, no tóxico y ecológico (Mishra *et al.* 2014). Este enfoque toma sustento, debido a que su tamaño nanométrico, les confiere la habilidad para penetrar distintas membranas biológicas como la pared bacteriana, incrementando su efecto bactericida (Rojas *et al.*, 2020).

1.10.2 Biosíntesis de Nanopartículas de plata utilizando bacterias.

La biosíntesis implica el uso de microorganismos (bacterias, levaduras, hongos) o extractos de plantas para lograr la reducción de iones metálicos, incluidos plata, oro y cobre (Ronquillo de Jesús *et al.*, 2022). Se ha mostrado que los sobrenadantes de los cultivos de ciertas especies de bacterias como *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae* (Enterobacteriaceae) son capaces de promover la síntesis de nanopartículas de plata, con tan solo exponer durante un periodo de cinco minutos, los iones de plata ante los extractos filtrados de estos microorganismos. Algunas especies también son capaces de reducir iones de metales preciosos en solución o sintetizar nanopartículas metálicas tanto en el interior de la célula bacteriana o mediante los extractos de microorganismos de ayuda. Los extractos de los microorganismos a la vez pueden comportarse como agentes de limitación y como agentes reductores. La preparación de nanopartículas de plata mediante el uso de polisacáridos junto con agua como agente de tapa se reconoce como técnica de polisacárido la secreción de agentes reductores (enzimas) hacia el medio de cultivo (Hernández, 2013; Logeswari *et al.*, 2015)

1.10.3 Mecanismo de acción de nitrato de plata (AgNO₃)

Para la síntesis de NPs-Ag (nanopartículas de plata) se utiliza el nitrato de plata (AgNO₃) debido a su bajo costo, además, de su estabilidad comparada con otras sales derivadas de la plata (Plata, 2016). La plata se ha definido como un “**agente**

oligodinámico o biocida” debido a su capacidad para inhibir el crecimiento microbiano en bajas concentraciones (Fouda *et al.*, 2021), además, de que el AgNO_3 es altamente efectivo contra diversos patógenos, pero, se ha demostrado no ser tóxico para células animales vivas (Kaplan, 2015). Curiosamente, el nitrato de plata imparte diferentes funciones para las bacterias dependiendo de su concentración. En concentraciones más altas, mata las bacterias, mientras que, en concentraciones más bajas les induce a sintetizar plata (Fouda *et al.*, 2021).

En un estudio realizado por el departamento de microbiología y biología celular de la India, utilizando *Bacillus licheniformis* se usó AgNO_3 para medir su actividad bactericida, estas mismas fueron monitoreadas con microscopía de contraste de fases, al observarlas se detecta que comienzan a encogerse dando como resultado la formación de cuerpos apoptóticos característicos de una muerte celular programada (PCD, por sus siglas en inglés), dichos cuerpos se produjeron durante la permeabilización de la pared celular inducida por los iones de plata. Estas características se encuentran ausentes en bacterias que no fueron tratadas con dicho agente (Pandian *et al.* 2010).

Se han sugerido diversos mecanismos para explicar el método de acción de los iones de plata, por ahora en la Figura 4 se muestra un posible conjunto de reacciones que los iones Ag^+ inhiben particularmente al grupo tiol que contienen las enzimas, una de las principales afectadas es la NADH deshidrogenasa II en el sistema respiratorio, quien se encuentra vinculado con el sitio de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) ; es por ello que al inhibir la actividad de esta enzima provoca radicales libres y aumenta la producción de catalasa, para disminuir la concentración de H_2O_2 que es la fuente de los radicales libres. Sin embargo, el mismo sustrato (H_2O_2) en cantidades altas interrumpe la actividad de la catalasa. Además, se reporta que las ROS inducen rutas apoptóticas en bacterias, que terminan cuando el ADN se fragmenta. La inducción de la apoptosis puede confirmarse por dos factores que son la reducción del tamaño de las células (cuerpos apoptóticos) y la fragmentación del ADN (Pandian *et al.*, 2010).

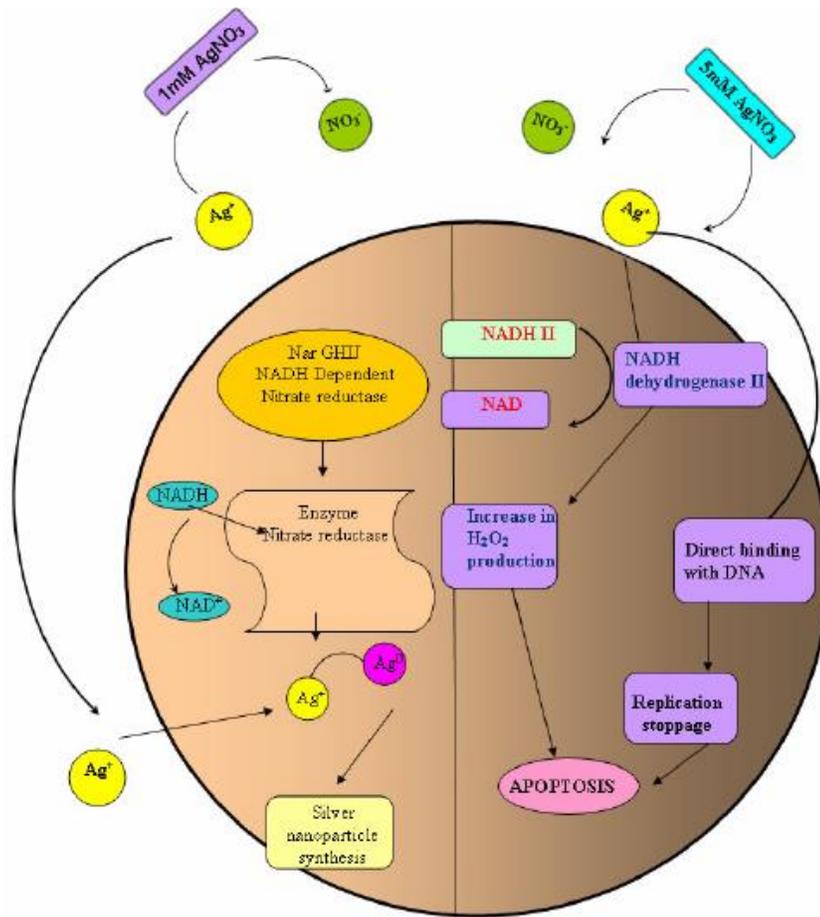


Figura 4. Mecanismo de acción del nitrato de plata. Fuente: Pandian *et al.*, 2010.

El efecto inhibitor de la plata es probablemente la suma de distintos mecanismos de acción. Varios estudios sugieren que los iones de plata reaccionan con los grupos SH de las proteínas y desempeñan un papel esencial en la inactivación bacteriana. Se ha informado que niveles micro molares de iones de plata desacoplan el transporte respiratorio de electrones de la fosforilación oxidativa, lo que inhibe las enzimas de la cadena respiratoria o interfieren en la permeabilidad de la membrana a protones y fosfato. (Liau *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 2000; Morones *et al.*, 2005)

Estudios realizados han demostrado la actividad de los iones de plata sobre *E. coli* (Gram negativa) y *Staphylococcus aureus* (Gram positiva), respectivamente se

trataron estas bacterias con AgNO_3 , y estudiaron los efectos sobre la morfología celular mediante microscopía electrónica combinada (TEM y SEM) y microanálisis de rayos X. *E. coli* y *S. aureus* sufrieron cambios morfológicos similares tras el tratamiento con iones de plata, caracterizados por un desprendimiento de la membrana del citoplasma de las paredes celulares y la aparición de una región electrón-luminosa en el centro de las células, que contenía moléculas condensadas de ácido desoxirribonucleico (ADN) formadas probablemente para proteger el ADN de las lesiones mediadas por los iones de plata (Feng *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2008; Duran *et al.*, 2010)

También se observaron pequeños gránulos densos en electrones alrededor de la pared celular o depositados en el interior de las células que causan cambios morfológicos descritos en presencia de iones de plata, las células bacterianas alcanzan un estado activo pero no cultivable y acaban muriendo de igual forma se sugiere que el grosor de la capa de peptidoglicano de las bacterias grampositivas puede influir en cierta medida en la acción de los iones de plata, ya que encontraron una mayor solución de iones de plata en bacterias gram negativas (Feng *et al.*, 2000, Jung *et al.*, 2008; Durán *et al.*, 2010)

Por otro lado se sabe que las nanopartículas de plata y los iones de plata inhiben el crecimiento bacteriano al desacoplar la cadena de transporte de electrones de bacterias, inhibir las deshidrogenasas de la cadena respiratoria e interrumpir la fosforilación oxidativa (Bardo y Holt, 2005; Marambio-Jones y Hoek, 2010; Thombre *et al.*, 2016)

En la Figura 5, se muestra un diagrama del posible mecanismo de acción de las nanopartículas de plata sintetizadas (AgNPs), donde los mecanismos plausibles de acción inhibitoria de los SNP en la haloarchaea pueden deberse a la fuga de la membrana arqueal por un pequeño tamaño de AgNPs que afectan la integridad de la membrana, la desestabilización de la cadena respiratoria, y peroxidación lipídica que genera ROS y MDA que conducen a la muerte de la haloarchaea por daño oxidativo y celular, daño en el ADN y apoptosis (Thombre *et al.*, 2016).

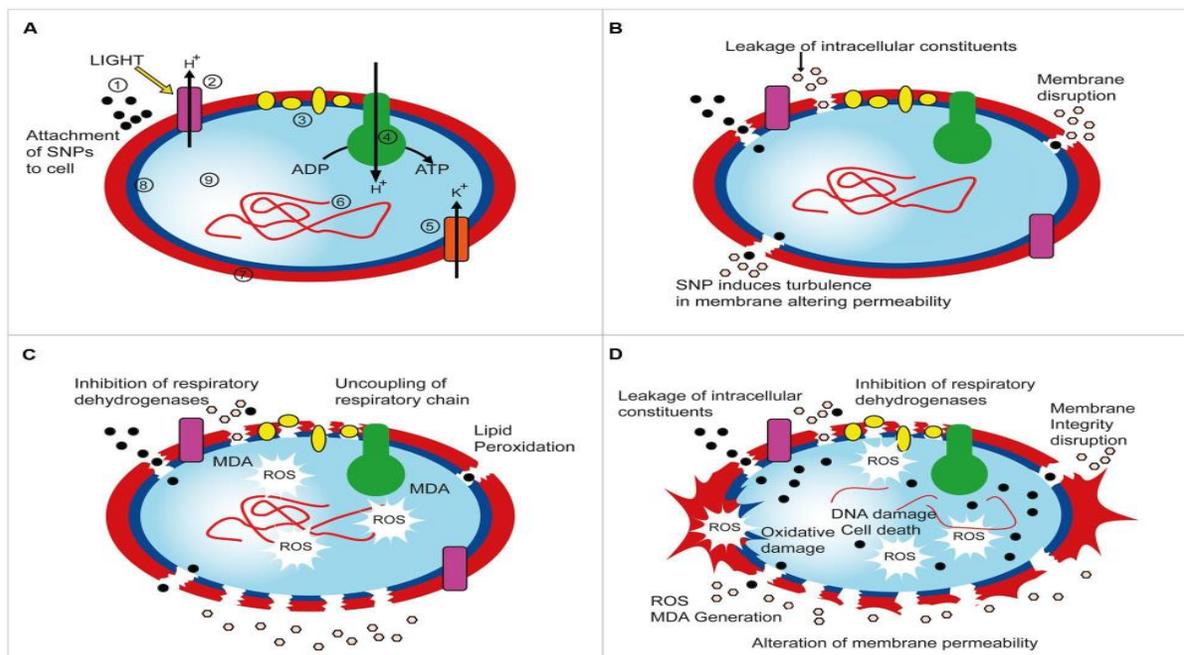


Figura 5. Posible mecanismo de acción de las Nanopartículas sintetizadas A) La AgNPs pueden unirse a las proteínas de capa S, glucoproteínas ácidas, proteínas no glicosiladas por adsorción u otros mecanismos. B) Después de la unión a la superficie de la haloarchaea, las AgNPs pueden causar daño físico y formar poros en la membrana, interrumpiendo la permeabilidad de la membrana debido a la turbulencia, puede alterar la integridad de la membrana y entrar en el citosol celular, lo que lleva a la fuga de los componentes citosólicos intracelulares. C) Las AgNPs también pueden transportarse a través de porinas o canales iónicos, sin embargo, el modo de internalización de los SNP en la célula no está claro en gran medida. Mientras dañan la integridad de la membrana, los SNP pueden afectar las deshidrogenasas respiratorias y la cadena de transporte de electrones, lo que lleva a la generación de estrés intracelular, peroxidación lipídica, generación de MDA (malondialdehído indicador común de peroxidación lipídica) y especies reactivas de oxígeno (ROS). D) Las ROS generadas posteriormente pueden causar daño oxidativo, daño en el ADN y daño celular y todos estos procesos juntos conducen a la muerte general de la célula.

1.11. Toxicidad de la plata

1.11.1 Toxicidad en plantas

La bioacumulación de iones de plata en vegetales se ha investigado previamente. En un estudio se expusieron plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) con AgNPs a 100 mg/L y se encontró que las hojas contenían 18.93 $\mu\text{g/g}$ de Ag^+ (Larue *et al.*, 2014, Castro González, 2018)

El-Batal *et al.* (2016) encontraron 0.35-0.49 $\mu\text{g/g}$ de iones de plata en hojas de frijol Bronco y Nebraska tratadas con 60 ppm de nanopartículas de plata.

En *Arabidopsis thaliana* se analizaron raíces y brotes después de haber sido sometidos a exposición por aplicación foliar de AgNPs de 75 y 300 ppm, en donde las raíces acumularon 10 veces más que los brotes (Geisler-Lee *et al.*, 2010).

En plantas de Stevia, la concentración de AgNPs utilizadas fueron de 100 y 200 ppm, al analizar la concentración de Ag⁺ en las hojas se observó una concentración de entre 95.23 y 188.16 µg/g (Castro, 2018).

2. ANTECEDENTES

El hongo que produce manchas negras en los Agaves está reportado como *Asterina mexicana*, sin embargo, un trabajo reciente ha reportado que se trata de un agente diferente: *C. lunata* el cual es responsable de causar la sintomatología de las manchas foliares observadas en las pencas de maguey (Hernández *et al.*, 2022). Hongo que, además, ha sido reportado como agente causal de enfermedades en diferentes cultivos como el piñón, cacao y chile habanero agente causal de enfermedades en el piñón, cacao y chile habanero.

La biosíntesis de nanopartículas de plata (bsAgNP) se realiza de diversas formas, con extracto de plantas, hongos y bacterias. Las nanopartículas así producidas han sido utilizadas como agente antimicrobiano contra *Bipolaris sorokiniana*, hongo causante de la mancha foliar en trigo y cebada, demostrando que las bsAgNP controlaron con éxito la infección de las plantas (Mishra *et al.*, 2014).

El mecanismo del Nitrato de plata fue descrito por Pandian *et al.* (2010), quienes determinaron que a concentraciones bajas (5 mM) se induce la síntesis de catalasas, se forman cuerpos apoptóticos y se promueve la fragmentación del ADN. Así como Thombre *et al.* (2016) Describen la importancia de la pared celular en el mecanismo de acción del nitrato de plata en haloarceas.

3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo del maguey pulquero, aprovechado de manera correcta e integral, resulta ser una opción económica que contribuye en el desarrollo de las comunidades; se estima que una hectárea sembrada puede ser rentable sin demasiados requerimientos y cuidados.

Sin embargo, los agricultores de la zona de los llanos de Apan refieren que se han enfrentado a diversas problemáticas que merman la producción, como escasa o nula capacitación para lograr un cultivo exitoso. Aunado al robo y comercio ilegal, a plagas, como el picudo y la negrilla, que causan una baja en la calidad y precio de las pencas, afectando también la producción de aguamiel y pulque.

Debido a que la zona de estudio es una de las principales productoras de cereales surge la preocupación de que dicho fitopatógeno al ser causante de infecciones y pérdidas de hectáreas de producción de cereales en otros países, surge la necesidad de saber si dicha cepa puede contaminar los cultivos de maíz los cuales son sembrados en las mismas parcelas donde el maguey es sembrado.

Actualmente, se tiene muy poca información sobre el agente causal de la negrilla, se desconoce cómo prevenirla o si puede generar problemas a la salud del consumidor. En esta tesis, se estudió el efecto antifúngico del nitrato de plata, para el tratamiento de la enfermedad causada por el fitopatógeno *B. zea*, con lo cual se busca prevenir la enfermedad o disminuir el daño en plantas ya infectadas.

Debido a que la zona de estudio es una de las principales productoras de cereales surge la preocupación de que dicho fitopatógeno al ser causante de infecciones y pérdidas de hectáreas de producción de cereales en otros países, surge la necesidad de saber si dicha cepa puede contaminar los cultivos de maíz los cuales son sembrados en las mismas parcelas donde el maguey es sembrado.

4. HIPÓTESIS

El nitrato de plata (AgNO_3) en concentraciones mayores, o iguales, a 100 ppm presenta un efecto antifúngico contra el hongo *B. zea*, tanto en medio de cultivo como en plantas de maíz y *A. salmiana*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

- Evaluar la actividad antifúngica del nitrato de plata (AgNO_3) mediante ensayos *in vitro* e *in planta* para determinar la dosis mínima que afecte el crecimiento de *B. zea*, hongo aislado de la mancha negra o “negrilla” del *A. salmiana*.

5.2 Objetivos específicos.

- Evaluar propiedades antifúngicas de las bionanopartículas de plata (bsAgNPs) sintetizadas extracelularmente a partir del sobrenadante de un cultivo axénico de *Leuconostoc mesenteroides*.
- Evaluar el porcentaje de germinación de esporas de *B. zea* mediante el conteo directo en cámara húmeda *in vitro*.
- Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de AgNO_3 *in vitro* contra el crecimiento del fitopatógeno en medio PDA.
- Evaluar la efectividad del AgNO_3 como agente preventivo para evitar infecciones por el hongo aislado de la negrilla en plántulas de maíz *in planta*
- Evaluar la efectividad del AgNO_3 como agente correctivo para disminuir el daño causado por la infección del fitopatógeno en plántulas de maíz y plantas de *A. salmiana*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Síntesis extracelular de bionanopartículas de plata.

6.1.1 Obtención de sobrenadante de *Leuconostoc mesenteroides*.

Para la biosíntesis de nanopartículas de plata se utilizó una cepa de colección de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B-3469, bacteria heterofermentativa, ácido-láctica que se encuentra involucrada en la fermentación de lácteos. La cepa fue inoculada en Agar Mayeux/MSE, medio de cultivo selectivo para bacterias del género *Leuconostoc* (Mayeux *et al.*, 1978). El medio fue esterilizado en autoclave a 121°C y a 15 psi durante 15 min, las placas inoculadas fueron incubadas durante 24 h a 37°C.

Para obtener el sobrenadante, la bacteria fue cultivada en caldo MSE, ajustado a menor cantidad de sacarosa (50 g/L) para limitar la producción de dextrano en cajas Petri. Se inocularon 25 mL de medio líquido en tubos falcón de 50 ml y se realizó por triplicado, dejando en incubación durante 14 h a 37 °C para obtener un inóculo en fase exponencial temprana y evitar la sobreproducción de metabolitos. Posteriormente, se centrifugó tres veces consecutivas a 5,000 rpm durante 5 min en cada una se recuperó el sobrenadante en un tubo Falcon estéril.

6.1.2 Reacción de síntesis con AgNO₃

Tomando como fundamento la metodología utilizada por Mishra y colaboradores (2014). Se prepararon tres soluciones de nitrato de plata con agua desionizada estéril y, se agregó al sobrenadante de *L. mesenteroides* obtenido en el paso anterior, para alcanzar una concentración final de 10mM y 60mM en un volumen final de 35 mL. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente y en ausencia de luz monitoreando el cambio de color, ya que la síntesis de bsAgNPs (bionanopartículas de plata) se caracterizan por la alteración del color del medio pasando de un color amarillo opaco (coloración inicial del sobrenadante) a marrón o negro (después de agregar la solución de AgNO₃).

6.1.3 Caracterización óptica de las nanopartículas biosintetizadas.

Para la caracterización óptica de las bsAgNP, se utilizó espectrofotometría UV-vis con un espectrofotómetro (Thermo Fisher scientific 4001/4) a una longitud de onda de 420 nm. Como control se utilizó una solución de AgNO₃ a 0.1M y sobrenadante de *L. mesenteroides*.

6.1.4 Caracterización en SEM de las nanopartículas biosintetizadas

Las muestras se montaron en una platina de metal usando cinta de carbón de dos caras y se recubrieron con una capa ultrafina de oro/paladio durante 500 s por pulverización catódica (Denton Vacuum DESK II, Mex). Posteriormente, las muestras se observaron bajo el SEM. Ubicado en la Escuela Superior de Apan (modelo JSM-5800LV, JEOL®, Mex). Para la descripción de la estructura y la descripción de las bsAgNPs. La composición elemental se confirmó y cuantificó utilizando EDS a 15 kV y 10mA.

6.2 Recolección y conteo de conidios.

6.2.1 Preparación de inóculo.

Para obtener los conidios de *B. zeae* se utilizó una cepa pura ya aislada de pencas de maguey pulquero con sintomatología de manchas foliares color negro, características de agaves contaminados. Se preparó medio PDA para inocular placas de Petri, se incubaron a 28°C durante 7 días.

6.2.2 Obtención de conidios.

Utilizamos una de las cajas con 7 días de crecimiento, inundando la placa petri con tween 20 al 0.01% para coleccionar los conidios con la técnica de arrastre descrito por Foolad *et al.*, (2000) realizando un cambio, sustituyendo la brocha por un asa de Driglasky estéril.

Otra técnica utilizada fue la obtención de conidios, macerando el medio de cultivo con inóculo en donde; el medio de cultivo se macera con mortero y pistilo, se agrega agua destilada estéril y con agitador magnético se coloca en una parrilla de agitación para obtener la mayor cantidad de esporas en el agua, se filtra con gasa estéril usando un embudo de vidrio para pasar la solución a un matraz estéril.

Para calcular la cantidad de esporas por mililitro se hizo un conteo en una cámara de Neubauer, en la cual se agregó una gota de 10µL y se observó en un microscopio óptico (VELAB Modelo: VE-B5) con el objetivo 40x. Cuando las muestras contenían un cantidad alta de conidios por campo se realizó una disolución de 1:100 respecto a la solución madre utilizando la ecuación 1.

$$Densidad = \frac{No.de\ células\ contadas}{superficie\ de\ conteo\ (mm^2) \times Profundidad(mm) \times dilución} \quad (1)$$

6.3 Evaluación de la actividad antifúngica de la bsAgNPs y el AgNO₃ en *B. zeae*.

6.3.1 Germinación en cámara húmeda y preparación de muestras.

La evaluación antifúngica se calificó siguiendo el método descrito en Foolad (2000), se esterilizaron portaobjetos con 2 cavidades cóncavas con una capacidad aproximada de 120 µL. En cada una de las cavidades se agregó una muestra de la solución conidial 1:100 de 10- 50µL + 50-100µL de bsAgNPs y se identificaron mediante coordenadas microscópicas 10 esporas de cada cavidad para evaluar su germinación durante 72 h. Los portaobjetos se colocaron dentro de la cámara húmeda y se incubaron en ausencia de luz a 27°C. Se utilizó como cámara húmeda una caja de plástico de 20 cm * 12 cm * 4 cm en condiciones semi estériles. Se desinfectó con alcohol al 70% y se mantuvo bajo luz UV durante 15 min; la humedad se mantuvo con papel filtro y se humedeció con agua desionizada estéril. Cada una de las muestras se realizaron por duplicado debido a que el portaobjetos tiene 2 cavidades (Tabla 1).

Tabla 1 Diseño experimental para la evaluación de actividad antifúngica de las bsAgNPs a 0.1M

PRUEBA	INÓCULO	TRATAMIENTO	REPETICIONES
Control positivo:	50 μ L de solución conidial 1:100 (SC)	50 μ L de H ₂ O estéril	X2
Control negativo	50 μ L de SC	30 μ L de H ₂ O estéril + 20 μ L de AgNO ₃ (0.02)	X2
Tratamiento 1	60 μ L de SC	40 μ L bsAgNPs [0.1M]	X2
Tratamiento 1.1	40 μ L de SC	60 μ L bsAgNPs [0.1M]	X2
Tratamiento 1.2	20 μ L de SC	80 μ L bs AgNPs [0.1M]	X2
Tratamiento 1.3	10 μ L de SC	100 μ L bs AgNPs [0.1M]	X2

Se realizó otra prueba de actividad antifúngica de las bsAgNPs a menor concentración (Tabla 2).

Tabla 2. Diseño experimental para la evaluación antifúngica de las bsAgNPs a 0.06 M

PRUEBA	INÓCULO	TRATAMIENTO	REPETICIONES
Testigo positivo:	50 μ L de Solución conidial 1:100 (SC)	50 μ L de H ₂ O estéril	X2
Testigo Negativo	50 μ L de SC	30 μ L de H ₂ O estéril + 20 μ L de AgNO ₃ 100 mM	X2
Tratamiento 2	60 μ L de SC	40 μ L bsAgNP 60 mM	X2
Tratamiento 2.1	40 μ L de SC	60 μ L bsAgNP 60 mM	X2
Tratamiento 2.2	20 μ L de SC	80 μ L bsAgNP 60 mM	X2
Tratamiento 2.3	5 μ L de SC	100 μ L bsAgNP 100 mM	X2

Las pruebas para evaluar la MIC (concentración mínima inhibitoria) del AgNO₃ a diferentes concentraciones de la germinación de esporas se realizó agregando 50 μ L de Solución conidial 1:100 y 50 μ L de AgNO₃ (tabla 3).

Tabla 3 Determinación de las MIC de AgNO₃

PRUEBA	INÓCULO	TRATAMIENTO	REPETICIONES
Control positivo	50µL de solución conidial 1:100 (SC)	50µL de H ₂ O estéril	X2
Control negativo	50µL SC	50 µL AgNO ₃ [1700 ppm]	X2
Tratamiento 3	50µL SC	50 µL AgNO ₃ [100 ppm]	X2
Tratamiento 3.1	50µL SC	50 µL AgNO ₃ [200 ppm]	X2
Tratamiento 3.2	50µL SC	50 µL AgNO ₃ [50 ppm]	X2

Tabla 4 Diseño experimental de la evaluación antifúngica del AgNO₃ con las concentraciones seleccionadas.

PRUEBA	INÓCULO	TRATAMIENTO	REPETICIONES
Control positivo	50µL de Solución conidial 1:100 (SC)	50µL de H ₂ O estéril	X2
Control negativo	50µL SC	50 µL AgNO ₃ [1700 ppm]	X2
Tratamiento 4	50µL SC	50 µL AgNO ₃ [200 ppm]	X2
Tratamiento 4.1	50µL SC	50 µL AgNO ₃ [100 ppm]	X2

Las fotos de las esporas fueron tomadas con un microscopio Amscope AC85 con dos cámaras HD de 1 y 2 megapíxeles, y con una cámara de celular Xiaomi 11 lite de 45 megapíxeles.

6.3.2 Pruebas estadísticas

Los valores de p se obtuvieron al realizar pruebas ANOVA y Tukey para datos normales mediante una herramienta de complementos de Excel Megastat 2021.

6.4 Evaluación antifúngica del AgNO_3 contra *B. zea*. en medio de cultivo.

6.4.1 Crecimiento radial.

Una vez que se determinaron las concentraciones de esporas y la eficiencia de germinación en cámara húmeda, se procedió a resembrar el hongo *B. zea* por técnica de sacabocado para determinar su velocidad de crecimiento a concentraciones de 100 ppm y 200 ppm de AgNO_3 durante 7 días.

En PDA previo a su esterilización se agregó AgNO_3 para obtener una concentración final de 100 ppm y a 200 ppm para reportar su crecimiento. El crecimiento radial fue medido al trazar en cada placa Petri 4 direcciones a partir del centro donde fue posicionado el inóculo, fue registrado diariamente en cada toma de medida el incremento en milímetros del inóculo en su plano horizontal, sobre cada uno de estos ejes, la medición se realizó con un vernier digital a partir de las 0 h hasta las 168 h (Figura 6).

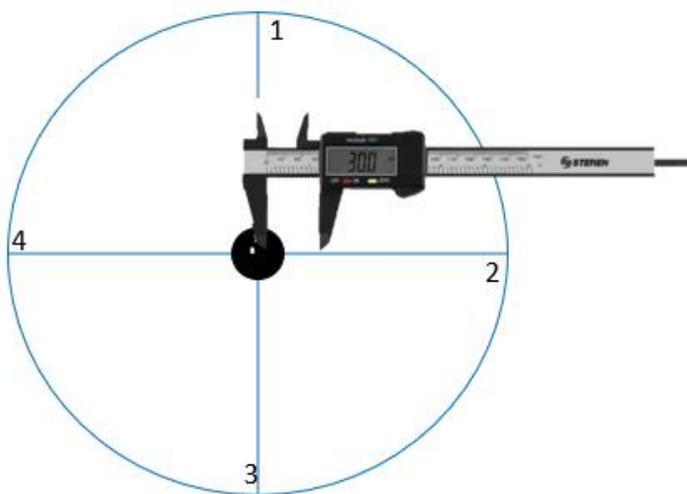


Figura 6. Técnica de medición de crecimiento radial.

Se utilizó la medición del diámetro de la colonia para evaluar el crecimiento fúngico después de 7 días. Los porcentajes de inhibición del crecimiento microbiano debido a los tratamientos de AgNO_3 se calcularon de acuerdo a la ecuación (2).

$$(\%) \text{ porcentaje de inhibición} = \frac{D_c - D_t}{D_c} * 100 \quad (2)$$

Dónde D_c es el promedio del crecimiento microbiano del control (mm) y D_t es el promedio del crecimiento microbiano en el tratamiento (Fouda *et al.* 2021).

6.5 Evaluación de posibles efectos tóxicos causados por las soluciones de nitrato de plata en las plántulas de *Z. mays*.

6.5.1 Diseño experimental

En el experimento 1 se establecieron dos controles de 5 plantas cada uno y dos tratamientos de 5 plantas cada uno respectivamente. Para el control H_2O las plántulas fueron asperjadas con agua estéril, el control de plántulas infectadas inició siendo asperjado con solución conidial de 3.5×10^6 conidios/mL cada tercer día durante 2 semanas, los grupos de plantas tratadas únicamente con solución de AgNO_3 a 100 ppm y 200 ppm se rociaron con 20ml de las soluciones cada tercer día durante 2 semanas.

(Figura 7)

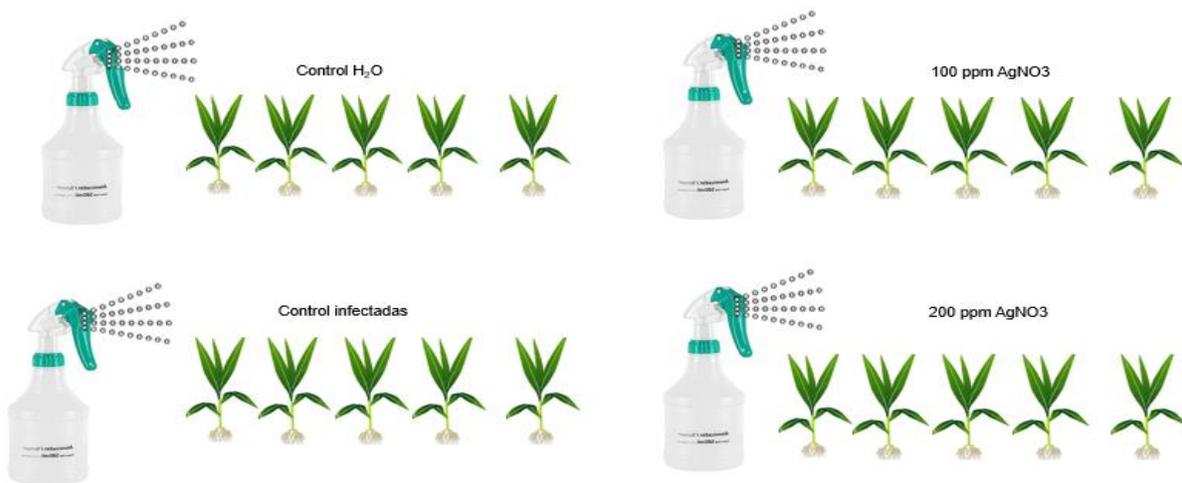


Figura 7. Diseño experimental de la evaluación de posibles efectos nocivos del AgNO_3 in planta.

6.6 Evaluación de la actividad antifúngica de los tratamientos a base de nitrato de plata contra el fitopatógeno *B. zeae* in planta de *Z. mays* y *A. salmiana*.

6.6.1 Diseño experimental del tratamiento preventivo:

En el tratamiento preventivo (Figura 8A) se establecieron 2 controles: Control H₂O en el que se seleccionaron 5 plántulas que solo fueron tratadas con agua estéril, y el control positivo donde 5 plántulas que fueron inoculadas con solución conidial de *B. zeae*. Por otro lado, se seleccionaron 30 plántulas: 15 fueron asperjadas con AgNO₃ a 100 ppm (TP 100 ppm) y las otras 15 con AgNO₃ 200 ppm (TP 200 ppm) durante 14 días partiendo de la semana 0 y semana 1 del experimento, posteriormente en el día 28 de su crecimiento (semana 2) fueron inoculadas con la solución conidial de *B. zeae*, para evaluar si el AgNO₃ funcionaba como agente protector para evitar la infección por el fitopatógeno (Figura 8B)

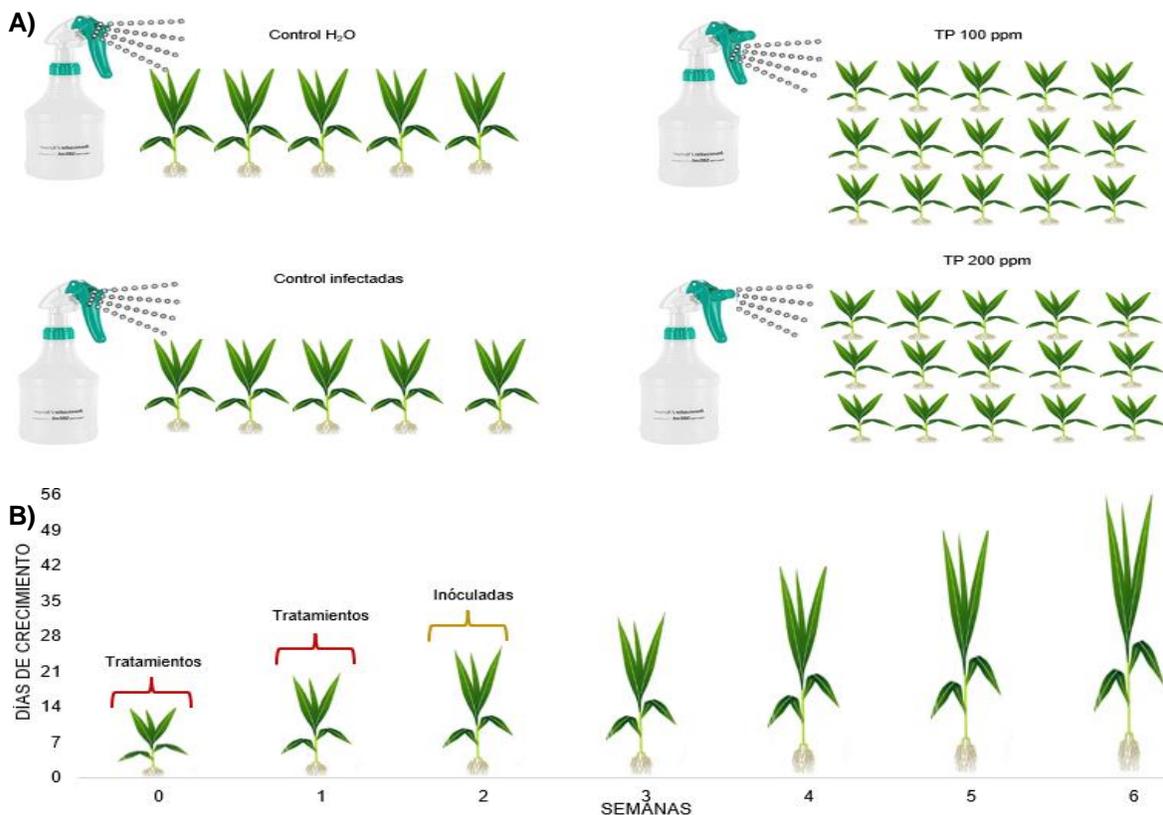


Figura 8. A) Diseño experimental del tratamiento preventivo in planta *Z. mays*. B) Diseño experimental de aplicación de tratamientos.

6.6.2 Diseño experimental del tratamiento correctivo.

El tratamiento correctivo (Figura 9A) fue muy similar al preventivo, se seleccionaron de igual forma 30 plántulas, las 30 plántulas se inocularon previamente con la misma solución conidial desde el día 14 de su crecimiento hasta el día 20, (semana 0 del experimento). Posteriormente al inicio del día 21 de crecimiento (semana 1) 15 plántulas fueron tratadas con AgNO_3 a 100 ppm y las otras 15 fueron tratadas con AgNO_3 a 200 ppm el tratamiento fue aplicado durante la semana 1 y semana 2 del experimento para evaluar la actividad antifúngica del AgNO_3 como agente reductor o correctivo de la infección por la cepa *JCP-NY* de *B. zea* (Figura 9B).

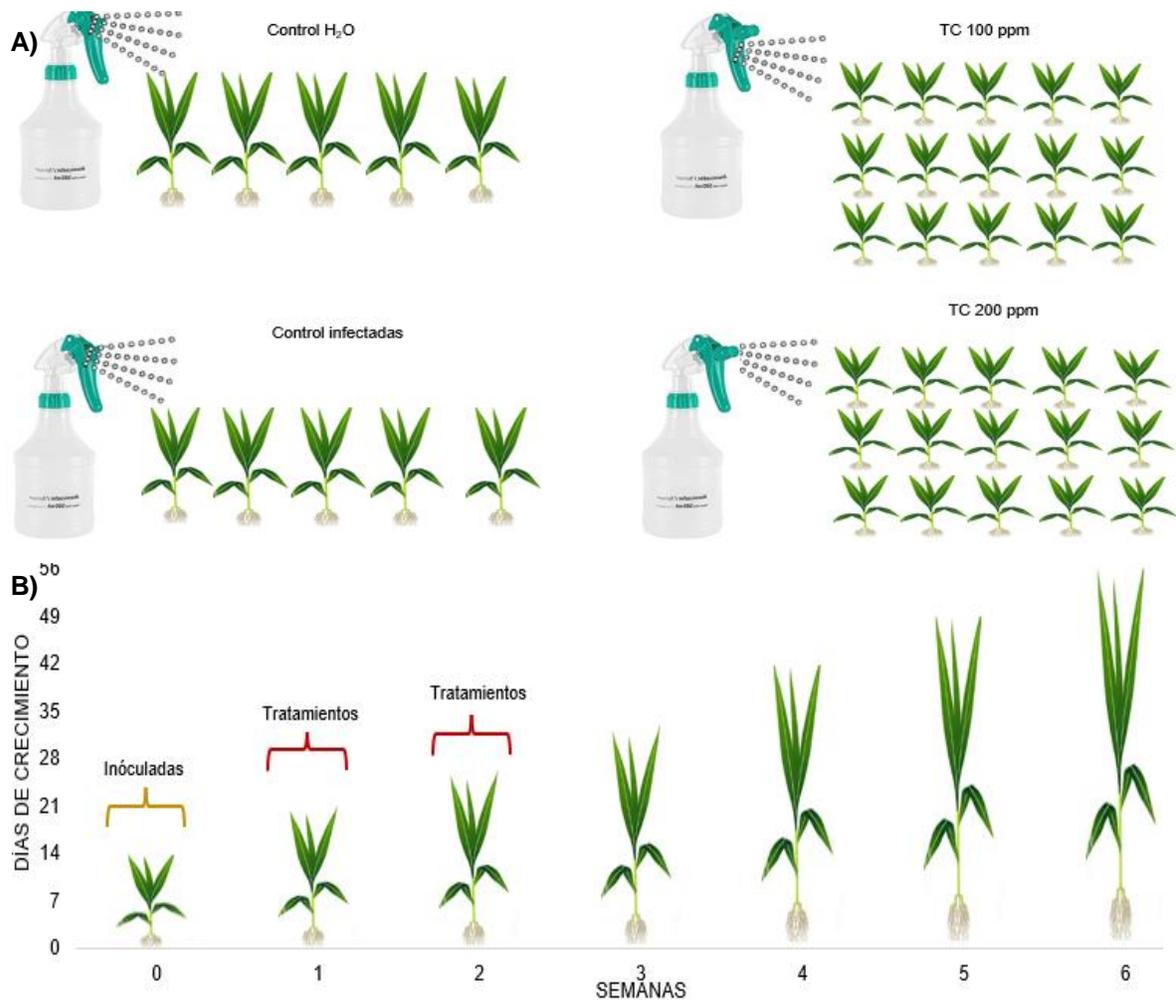


Figura 9. Tratamiento correctivo. A) *Diseño experimental in planta Zea mays.* B) *Diseño experimental de aplicación de tratamientos.*

Todos los experimentos tuvieron una duración de 6 semanas en las cuales se evaluaron varios aspectos:

- Crecimiento del tallo de la planta
- Cantidad de hojas verdes
- Cantidad de hojas secas.

6.6.3 Evaluación de la actividad antifúngica correctiva del AgNO_3 en hojas de *A. salmiana* infectadas.

En pencas de maguey con sintomatología de manchas foliares negras se seleccionaron 6 zonas afectadas como control positivo las cuales fueron asperjadas únicamente con agua estéril (Control H_2O) De igual forma 6 zonas fueron elegidas para ser tratadas con AgNO_3 100 ppm y 6 zonas para AgNO_3 200 ppm de las cuales se calcularon el diámetro o área para determinar la disminución del diámetro de la mancha negra después de aplicar el tratamiento correctivo con las soluciones de AgNO_3 .

Debido a que la morfología de las manchas no era circular sino más bien elíptica se tomaron medidas con vernier digital y obtuvieron las medidas de ambos radios previo al inicio del tratamiento. Al inicio del experimento semana los grupos de manchas negras se rociaron 3 veces por semana con las soluciones correspondientes de AgNO_3 y el grupo control con agua destilada estéril. Posteriormente cada semana se realizaron las mediciones de cada radio y al término se calcularon las áreas de cada grupo de manchas por semana y se obtuvo el porcentaje de disminución del área de la mancha.

6.7 Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas ANOVA y Tukey con complementos de Excel MegaStat para identificar las semanas en la que se logra el efecto esperado en cada tratamiento y determinar qué tratamiento resulta más efectivo.

7. RESULTADOS

7.1 Biosíntesis de nanopartículas de plata.

Se llevó a cabo la síntesis extracelular por *Leuconostoc mesenteroides* y se monitoreo mediante el espectro UV-vis que mostró una fuerte Resonancia Plasmónica Superficial a 410 nm, característica de las bionanoparticulas de plata (Mishra *et al.*, 2014) dando como resultado el cambio de color del sobrenadante de *L. mesenteroides*, tal como se muestra en la Figura 10.

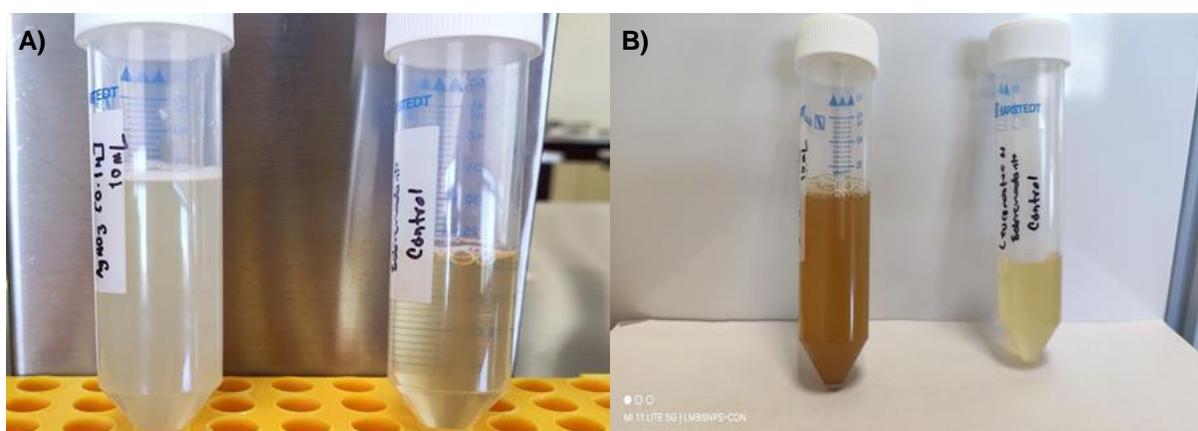


Figura 10. Biofabricación de bsAgNPs. A) Toma de 1ª muestra al tiempo cero. B) Toma de 5ª muestra 4 h después.

La toma de muestras se realiza por triplicado, a una amplitud de 420 nm obteniendo las siguientes lecturas (Tabla 5).

Tabla 5. Lectura de absorbancias en el espectrofotómetro UV-vis a 420 nm

TIEMPO (h)	AgNO ₃ (0.1M)	SOBLM	MIX
0	0.012	0.4233	0.9233
1	0.0153	1.0833	1.51
2	0.0276	1.88	2.3073
3	0.0326	2.2033	2.8556
4	0.0383	2.4933	3.9567
5	0.0406	2.6	>4

Para las lecturas se tomó en cuenta la absorbancia del AgNO_3 y la del sobrenadante para descartar o confirmar la posible síntesis de nanopartículas de plata al hacer una comparación con las absorbancias de las bsAgNPs.

Cuando se tomó la lectura a las 4 horas hay una saturación de la muestra de bsAgNPs obteniendo una absorbancia <4 A considerándolo el punto más alto de la biosíntesis. Debido a ello se realiza una dilución inmediata de la muestra a 1:100 y se lee la muestra teniendo una lectura promedio de 0.452 A aumentando a 0.580 A al tomar la muestra de la hora 5 como se muestra en la Fig. 11. Al realizar el análisis estadístico hay un valor de $p \leq 0.05$ desde la hora 3 entre las absorbancias de las muestras analizadas.

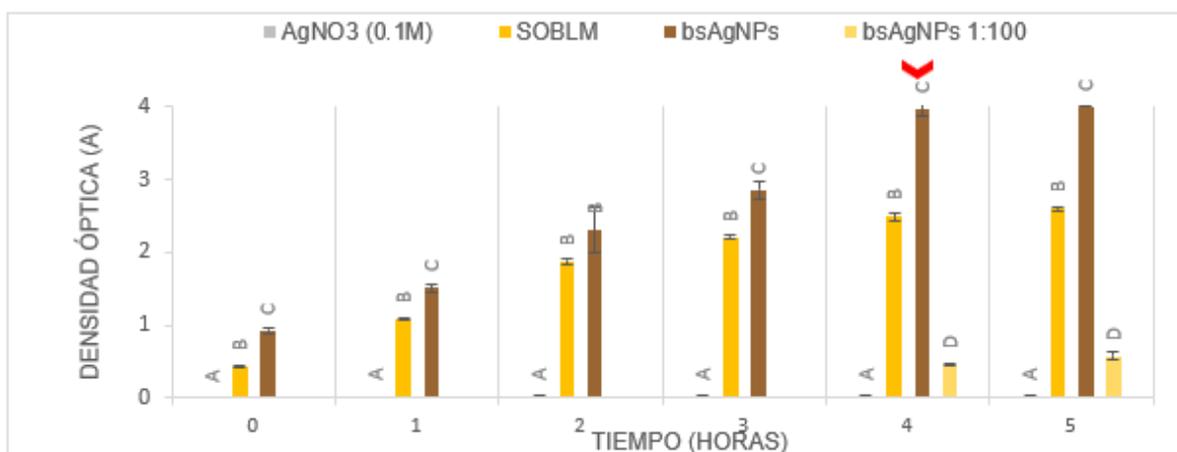


Figura 11. Lectura de absorbancias Espectro UV-vis durante la biosíntesis de nanopartículas de plata. AgNO_3 es una solución de nitrato de plata 0.1M. SOBLM: es el sobrenadante después de ser centrifugado. bsAgNPs: es el mix de sobrenadante de *L. mesenteroides* y solución de AgNO_3 a 0.1M. bsAgNPs 1:100: Muestra diluida a 1:100 por saturación. Flecha roja indica el momento de saturación de la muestra. Letras diferentes valor de $p \leq 0.05$. Análisis realizado con Tukey.

Al realizar la dilución de la muestra de bsAgNPs a la hora 4 y hora 5, las lecturas de absorbancia obtenidas se multiplican por el factor de dilución: 100 como se muestra en la Fig 12.

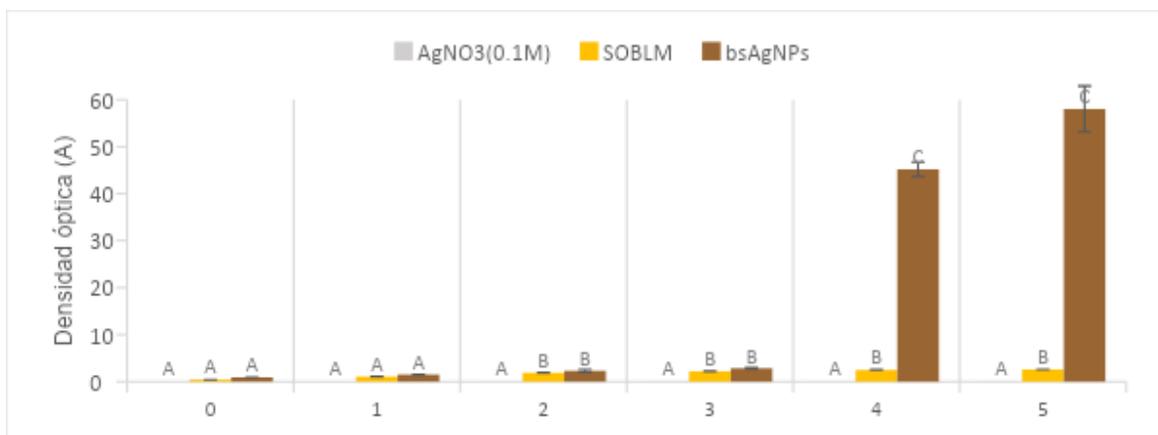


Figura 12. Lectura de absorbancias Espectro UV-vis durante la síntesis de nanopartículas de plata. AgNO₃ es una solución de nitrato de plata 0.1M. SOBLM: es el sobrenadante después de ser centrifugado y bsAgNPs es el mix de sobrenadante de *L. mesenteroides* y solución de AgNO₃ a 0.1M. Flecha roja indica multiplicación de las lecturas por el factor de dilución (100). Letras diferentes valor p≤0.05. Análisis estadístico realizado por Tukey.

7.3 Caracterización en SEM de las nanopartículas biosintetizadas.

Para confirmar si la biofabricación de nanopartículas de plata había sido exitosa se analizaron las muestras en Microscopio electrónico de barrido SEM (Scanning Electron Microscopy por sus siglas en inglés) como se muestra en la Fig. 13. Las bsAgNPs presentan una forma irregular con un tamaño de 0.1 - 0.3 μm

Además, de que en el mapeo al identificar los componentes químicos presentes se notó la presencia de Carbono (C) y Oxígeno (O) en 100% y 80% aproximadamente debido a la composición química del dextrano (C₆H₁₀O₅) metabolito principal producido por la bacteria *L. mesenteroides*, que se encuentra presente en el sobrenadante con el que se realizó el mix. También 10% de sodio (Na) debido a que el sobrenadante contiene citrato de sodio, 10% de azufre (S) y potasio (K) minerales presentes en los componentes del medio de cultivo MSE/Mayeux (Escartin Torres, 2017).

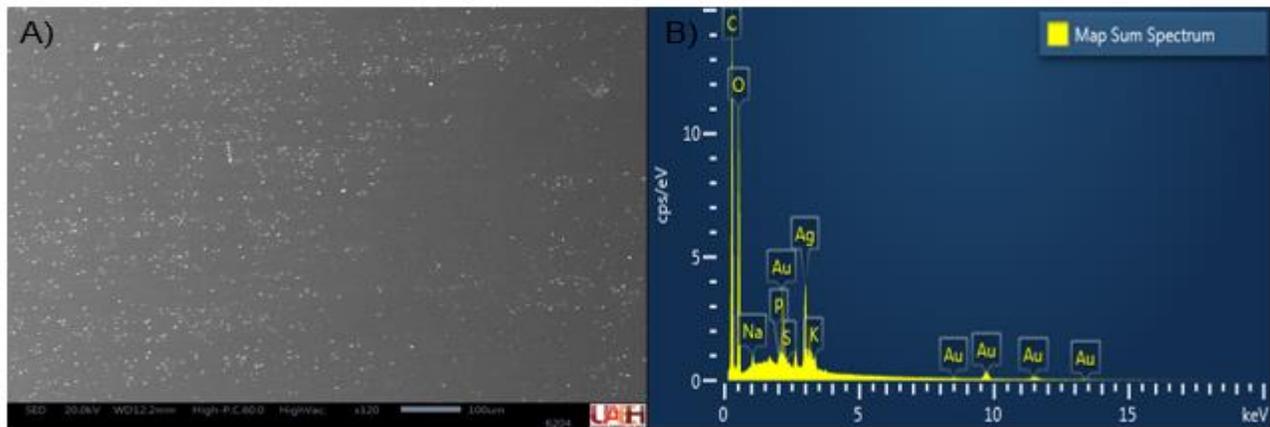


Figura 13. Caracterización y composición de las bsAgNPs a 0.1 M. A) Caracterización de las bsAgNPs a 0.1M. B) Composición química de AgNPs a 0.1M.

7.4 Evaluación antifúngica de las bionanopartículas de plata.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las bionanopartículas de plata se analizaron 10 esporas de cada cavidad de los portaobjetos cóncavos determinando su posición mediante coordenadas, ubicándose para monitorear su germinación. Se utilizó agua como control positivo y se agregó 10 μL de solución conidial (SC) a 3.5×10^6 conidia/mL, un control con solución de AgNO_3 0.1 M y cuatro tratamientos en los que se agregaron 40, 60, 80 y 100 μL de bsAgNPs con 10 μL de SC en cada uno.

En la Figura 14, se observan los resultados de las 0 a las 72 h, el control con agua solamente (Fig.14 A) tuvo un promedio de germinación de 88% de las esporas seleccionadas, teniendo una diferencia estadísticamente significativa $p \leq 0.05$ con el control AgNO_3 y con los tratamientos. El control AgNO_3 0.1 M (Fig. 14 B) se implementó para comparar la germinación de las esporas con respecto a los tratamientos con bsAgNPs para descartar la actividad antifúngica del AgNO_3 y determinar la viabilidad de las bionanopartículas. Sin embargo, en este control no hubo germinación de las esporas identificadas transcurrido el tiempo de prueba. En los tratamientos, los conidios testados con 40 μL y 60 μL de bsAgNPs solo germinaron el 8% (Fig. 14 C y D), en el tratamiento de 80 μL germinó el 5% (Fig.24 F) con 100 μL no hubo germinación (Fig 14 G) se determina un valor $p > 0.05$ respecto al control AgNO_3 .

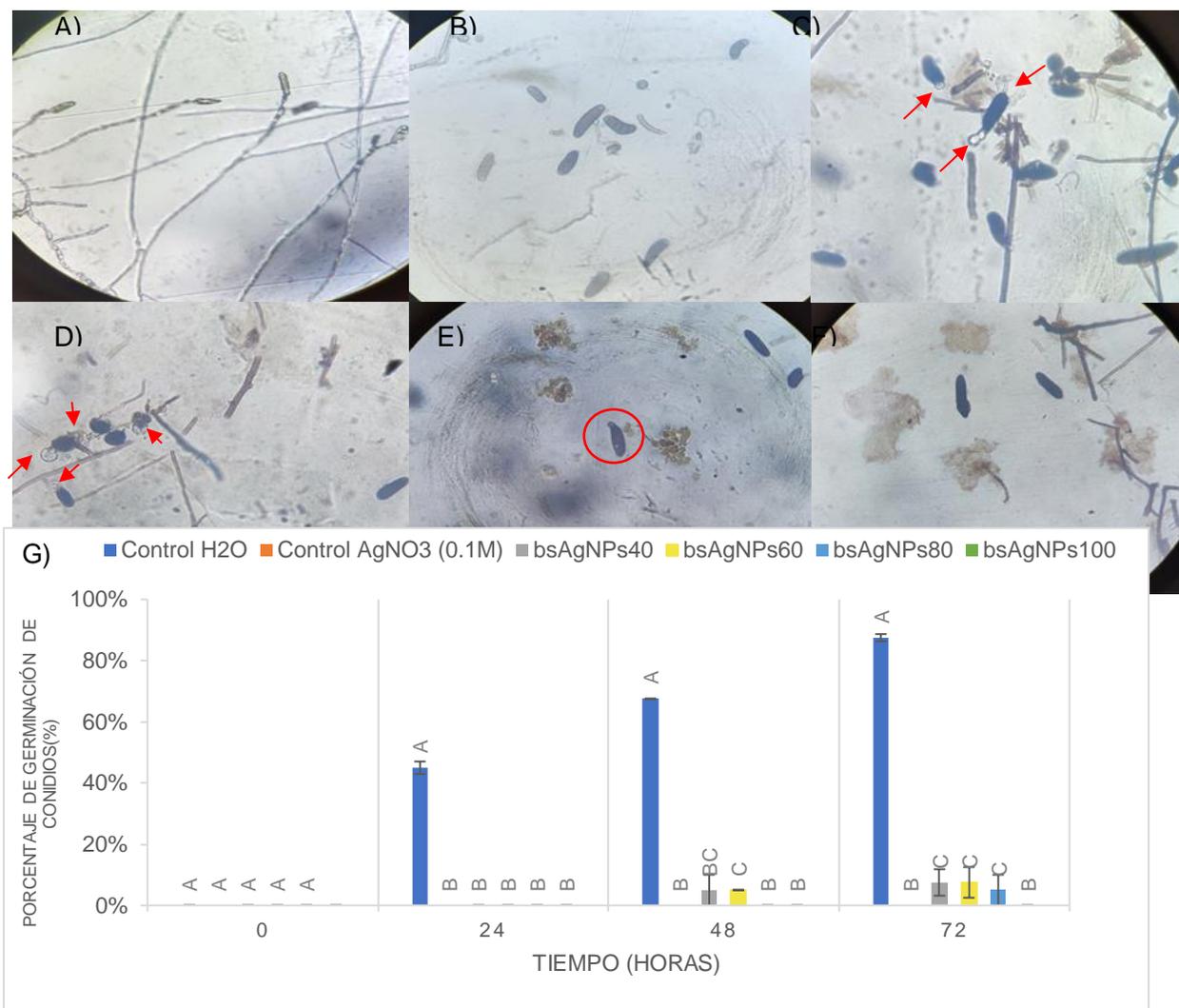


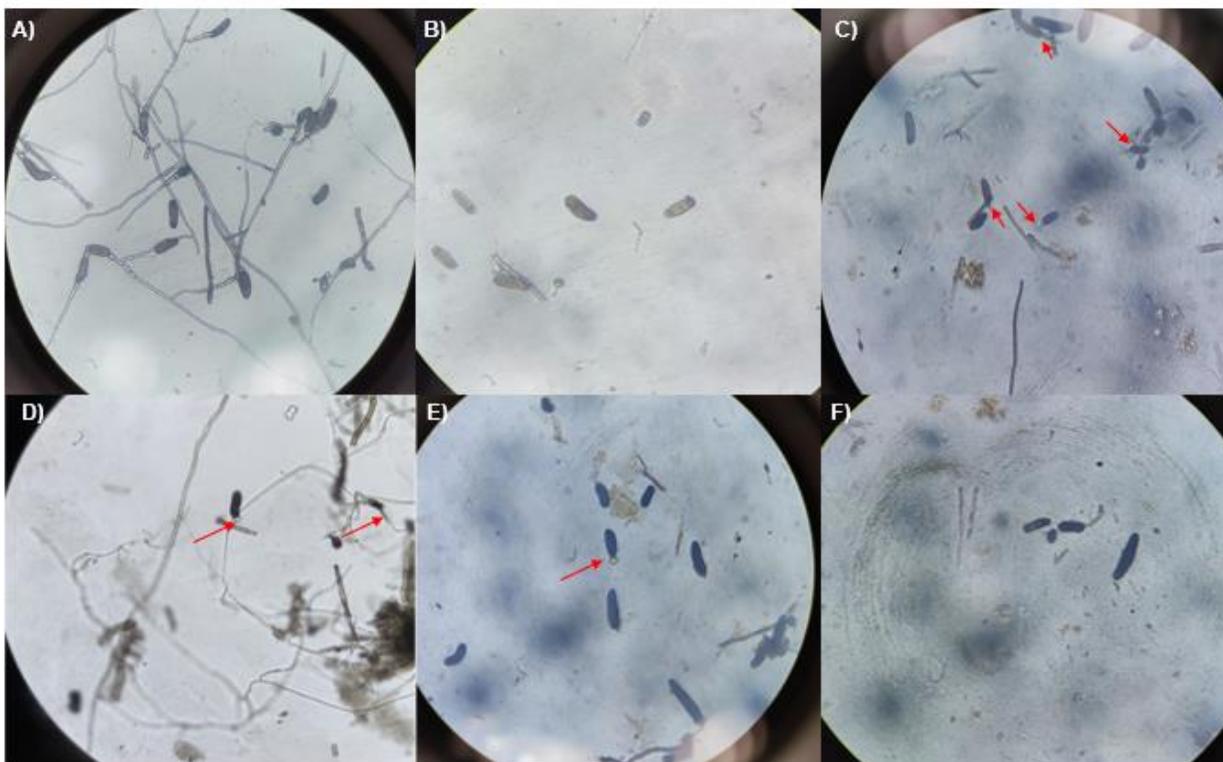
Figura 14. Evaluación de la actividad antifúngica de las bsAgNPs 0.1 M. A) Conidias germinados en Control H₂O. B) Conidias sin germinar en Control AgNO₃ 0.1M. C) Conidias en fase inicial de germinación bsAgNPs40. D) Conidias en fase inicial de germinación bsAgNPs60. E) Conidias en fase inicial de germinación bsAgNPs80. F) Conidias sin germinar bsAgNPs100. Lente objetivo 40x. Flechas rojas indican la forma de germinación de las conidias después de ser tratadas. G) Análisis estadístico. Letras diferentes valor de $p \leq 0.05$. Realizado con Tukey.

Cabe mencionar que en los conidios tratadas con 40 μ L y 60 μ L presentaron una germinación interrumpida, ya que se observa el brote de la hifa, sin embargo, no hay un desarrollo completo (Flechas de color rojo) (Fig. 14 A y B).

Al determinar que no existía una diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de germinación del control de nitrato de plata y los tratamientos, se biosintetizaron nanopartículas de plata a concentración de (0.06 M) para descartar la

posibilidad que el nitrato de plata era el agente inhibitorio y que no hubo formación de nanopartículas de plata.

En la Figura 15 transcurridas las 72 h se muestra nuevamente que el control H₂O mantuvo el valor $p \leq 0.05$ respecto al control AgNO₃ (0.06 M) y los tratamientos con un promedio de germinación del 90% de las esporas seleccionadas (Fig. 15 A). El control de nitrato de plata no presentó germinación (Fig. 15 B), y los tratamientos bsAgNPs 40 μ l germinó 10% (Fig. 15 C) 60 μ l de bsAgNPs 8% (Fig. 15 D), bsAgNPs 80 μ l y bsAgNPs 100 μ L solo un 3% (Fig. 15 E y F), teniendo un valor de $p > 0.05$ sin diferencia estadísticamente significativa de los tratamientos respecto control de AgNO₃ (Fig. 15 G), tomando en cuenta que la germinación en los tratamientos se interrumpe en la fase inicial debido a esto no se desarrollan correctamente las hifas.



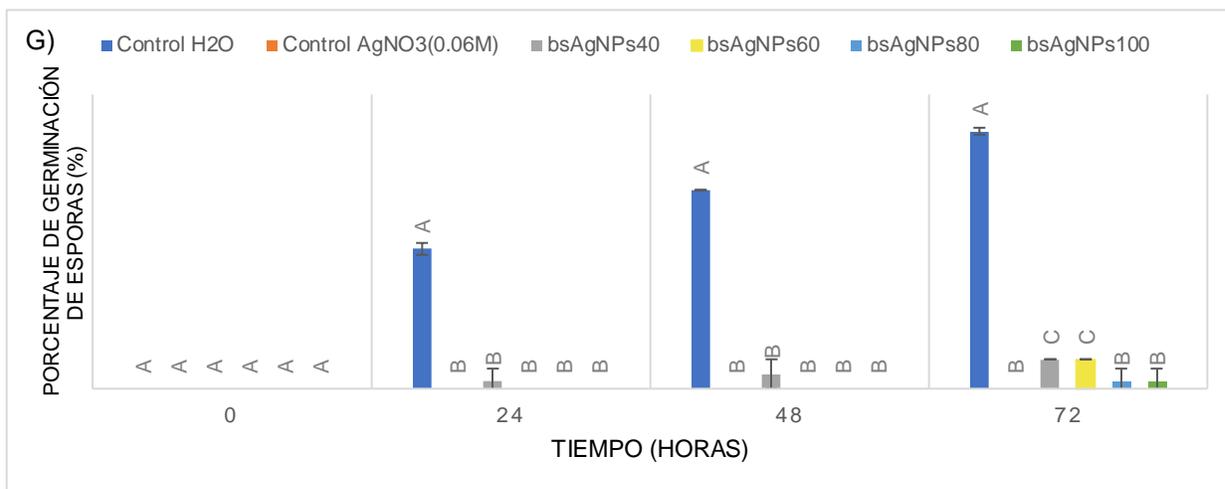


Figura 15. Evaluación de la actividad antifúngica de las bsAgNP 0.06 M. a 72h. A) Conidias germinadas en Control H₂O. B) Conidias sin germinar en Control AgNO₃ 0.06M. C) Conidias en fase inicial de germinación bsAgNPs40. D) Conidias en fase inicial de germinación bsAgNPs60. E) Germinación de conidias bsAgNPs80. F) Germinación conidial bsAgNPs100. G) Análisis estadístico, letras diferentes valor $p \leq 0.05$. Realizado con Tukey. Flechas rojas indican la etapa de germinación. Fotos tomadas del Microscopio óptico objetivo 40X.

7.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria del AgNO₃

En el experimento previo se identificó que la dosis de AgNO₃ era muy alta e inhibía la germinación de las esporas es por ello que se decidió hacer únicamente la evaluación de la actividad antifúngica del nitrato de plata a diferentes concentraciones para determinar la concentración mínima inhibitoria. De acuerdo a Young Ki Jo *et al.* (2009), la concentración mínima inhibitoria del AgNO₃ con respecto a conidias de *B. sorokiniana* es a partir de 100 ppm. Debido a ello se eligieron tres concentraciones de AgNO₃ para confirmar dichos resultados.

En este experimento se emplearon dos controles: un control de solución conidial y un control con nitrato de plata ~10,200 ppm (AgNO₃ 0.06 M) y cuatro tratamientos con 50 μ L SC + 50 μ L de AgNO₃ a (T50 ppm), (T100 ppm) y (T200 ppm).

La Fig. 16 muestra que a las 72 h las esporas tuvieron una germinación promedio de 85% en el Control H₂O (Fig. 16 A), el 0% en el control AgNO₃ 0.06 M (Fig. 16 C), el 63% a 50 ppm (Fig. 16 D y E), el 20% a 100 ppm (Fig. 16 F y G) y 0% a 200 ppm (Fig. 16 H). El análisis estadístico muestra que existe una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre el control H₂O con respecto al control AgNO₃ y los tratamientos de 0, 50 y 100 ppm, pero no con 100 ppm hay un valor de $p > 0.05$, sin embargo, no existe diferencia significativa con el tratamiento a 200 ppm. Estos

resultados demuestran que el nitrato de plata inhibe la germinación de conidios a concentraciones mayores de 100 ppm.

En la Figura 16 B, se muestra la germinación bipolar en una conidia del fitopatógeno *B. zae*, la germinación bipolar de los conidios es una característica del género *Bipolaris* en comparación con *Drechslera*, cuyos conidios germinan a partir de cualquier célula; aunque esta característica por sí sola, no un criterio fiable para la identificación de *Bipolaris* (Alcorn, 1983). Otro rasgo distintivo es que los conidios de *Drechslera* son cilíndricos, mientras que los de *Bipolaris* son fusiformes y elipsoidales (Paz *et al.*, 2006).

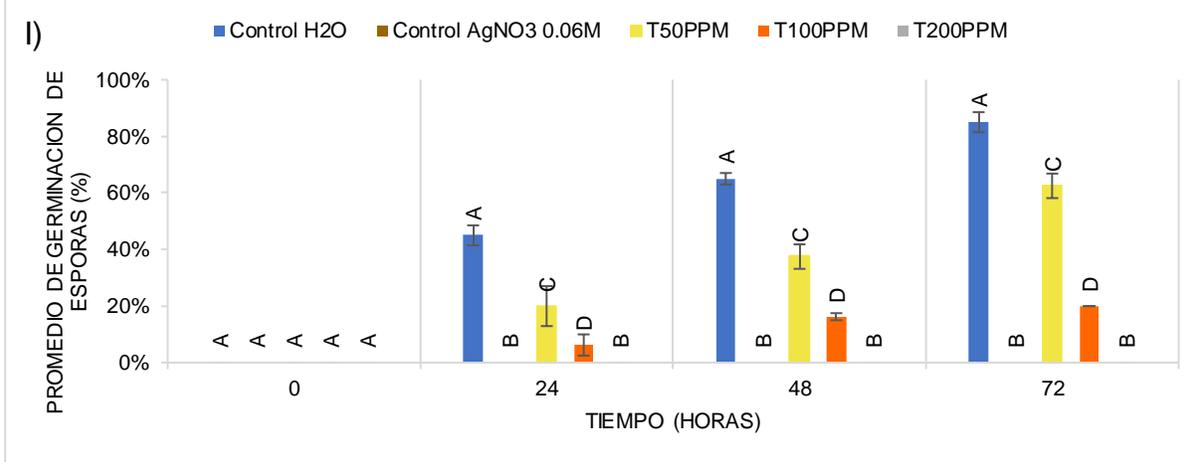
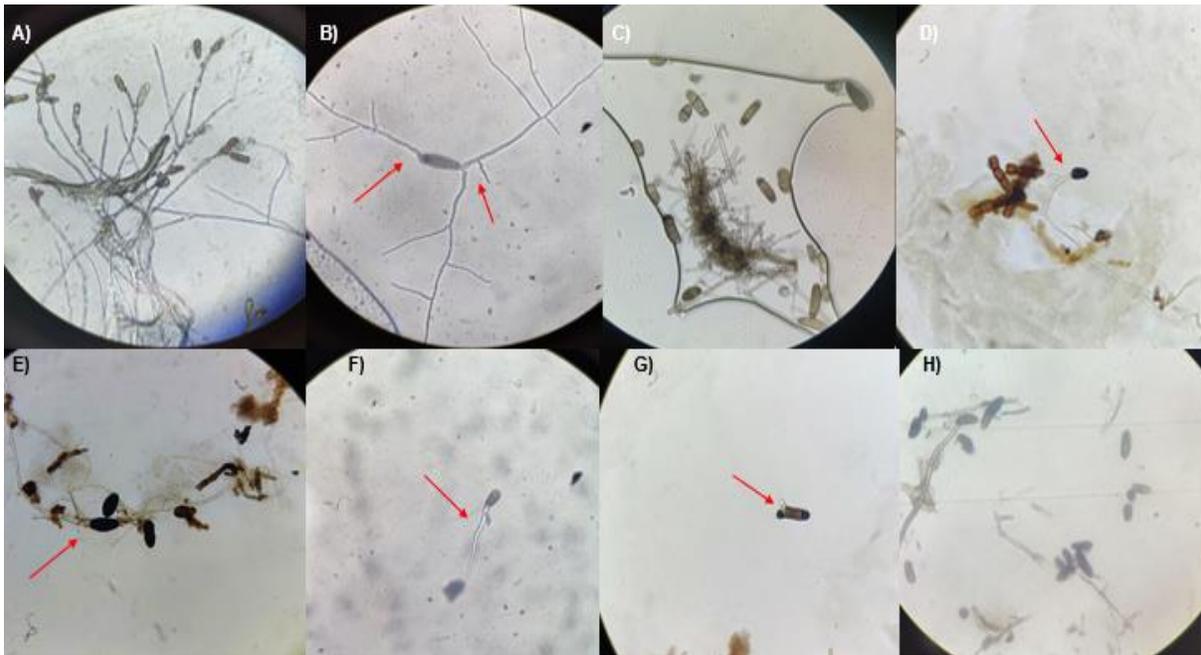


Figura 16. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) del AgNO₃ a 72h. A) Control H₂O Germinación total de las conidias seleccionadas. B) Conidia identificada del control H₂O con germinación bipolar característica de la cepa de *B. zea*. C) Control AgNO₃ (0.06M) D) y E) T50 ppm identificación de conidias germinadas. F) y G) T100 ppm germinación de Conidias. H) T200 identificación de germinación en conidios seleccionados. I) Análisis estadístico. Letras diferentes valor p≤0.05, realizado por Tukey. Flechas rojas indican desarrollo de hifas. Fotos tomadas del Microscopio óptico objetivo 40x.

Debido a los resultados anteriores, se seleccionaron las concentraciones de 100 y 200 ppm de nitrato de plata para los siguientes tratamientos *in vitro* e *in planta*; tomando en cuenta también la norma oficial mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 que establece las concentraciones máximas permitidas de plata en suelo de uso agrícola 390 ppm y en cuerpos de agua (0.5 ppm). (SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES (SEMARNAT) 2007. NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Ciudad de México)

Para saber si las concentraciones seleccionadas estaban dentro de los límites establecidos en la NOM, se calculó la proporción existente de plata en 100 ppm y 200 ppm de AgNO₃, obtuvimos el siguiente resultado.

- **P.M. AgNO₃ = 169.87 g/mol**
- **P.M Ag⁺ = 107.86 g/mol**

$$\text{Proporción de Ag} = \frac{107.87 \text{ g/mol}}{169.87 \text{ g/mol}} = 0.635$$

$$\text{Proporción} = (0.635) * (100 \text{ ppm}) = 63.5 \text{ ppm Ag}^+$$

$$\text{Proporción} = (0.635) * (200 \text{ ppm}) = 127 \text{ ppm Ag}^+$$

Se concluyó que la cantidad de plata utilizada en estos estudios está dentro de las concentraciones permitidas por la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 para suelos de uso agrícola, pero están por arriba de las permitidas para cuerpos de agua.

Se realizó una segunda prueba de cámara húmeda para corroborar que las concentraciones de nitrato de plata mantuvieron un comportamiento constante respecto a la prueba anterior.

7.6 Evaluación de la actividad antifúngica del AgNO_3 , crecimiento radial en placas Petri.

Para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento del fitopatógeno, se midió el crecimiento radial de *B. zeae* en PDA con 100 y 200 ppm de AgNO_3 , durante 168 h (7 días, Figura 17).

El AgNO_3 puede inhibir el crecimiento del hongo *B. zeae* en las condiciones probadas. En la Fig. 17 A, se muestra el crecimiento del fitopatógeno después de 7 días en un medio sin nitrato de plata. El crecimiento del inóculo en PDA con AgNO_3 100 ppm (Fig. 17 B) y 200 ppm (Fig. 17 C). El crecimiento de *B. zeae* se inhibió en $61.4 \pm 3.17\%$ a 100 ppm y $63.65 \pm 3.27\%$ a 200 ppm el análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 17 D). Este resultado es similar a lo reportado para otros hongos (Ki Jo, *et al.*, 2009).

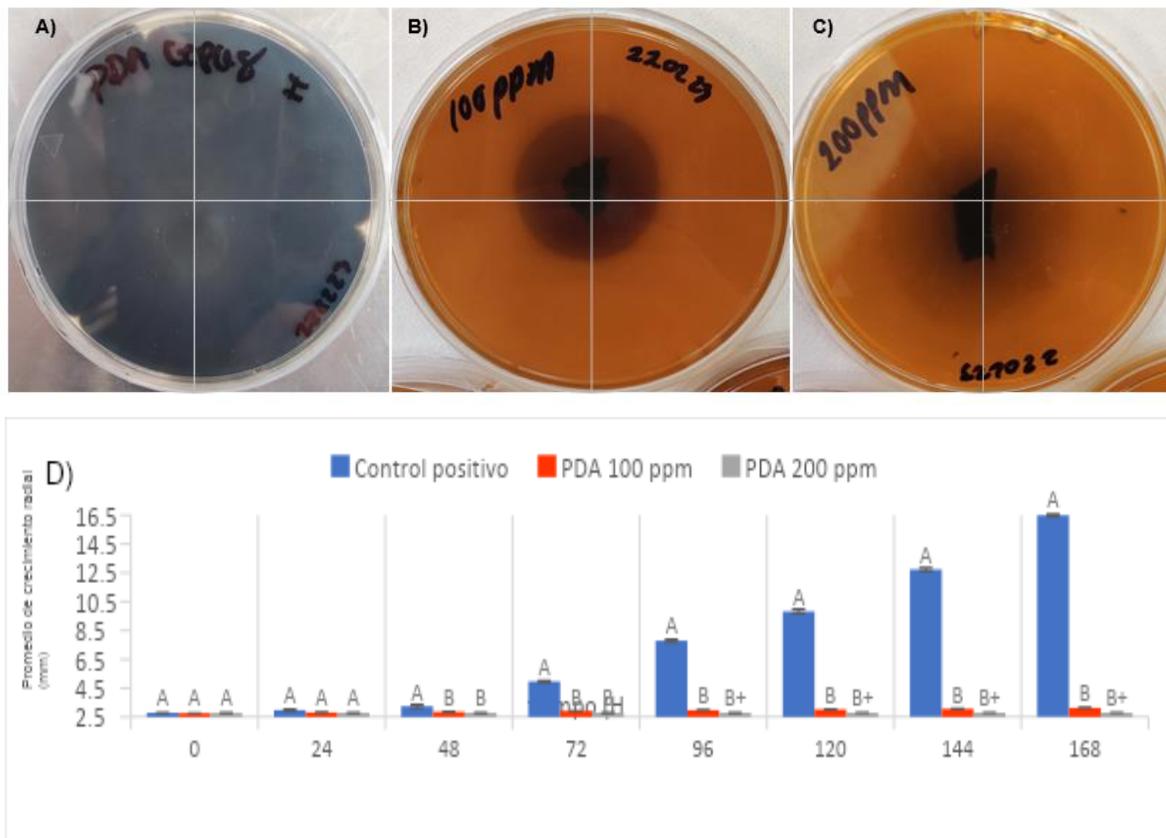


Figura 17. Velocidad de crecimiento radial del fitopatógeno *B. zeae* en placas petri. A) Control positivo PDA comercial. B) Inóculo de *B.zeae* en PDA a 100 ppm AgNO₃ C) Inóculo de *B. zeae* en PDA a 200 ppm AgNO₃ D) Análisis estadístico letras diferentes $p \leq 0.05$, "+" $p \leq 0.01$. realizado por Tukey.

7.7 Evaluación de efectos tóxicos del nitrato de plata en plántulas de *Z. mays*.

7.7.1 Crecimiento del tallo.

En el experimento se implementaron dos controles: un control de plantas asperjadas con agua (Control H₂O) y otro donde las plantas se inocularon con *B. zeae* (Control inf), de igual forma se determinaron 2 tratamientos con las concentraciones de nitrato de plata previamente seleccionadas (T100 ppm y T200 ppm). Los controles se utilizaron para considerar las características de una planta sana con respecto a una infectada para resaltar los síntomas que causa la enfermedad de "la negrilla", por ejemplo, el retraso en el crecimiento o en el desarrollo, pérdida de hojas, puntos necróticos entre otros que se pudieran observar. Los tratamientos se implementaron para resaltar las características que el AgNO₃ causara en las plantas, mismas que se pudieran confundir con las propias de la sintomatología provocada por la infección de la negrilla o identificar algunos diferentes causados por el compuesto.

En la Fig. 18, se muestra que no existe una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el crecimiento de las plantas del control positivo (Control H₂O) y el crecimiento de las plantas tratadas con AgNO₃ (T100 ppm) y (T200 ppm). Esto demuestra que el nitrato de plata, a 100 y 200 ppm, no tiene un efecto negativo significativo en el desarrollo de las plantas.

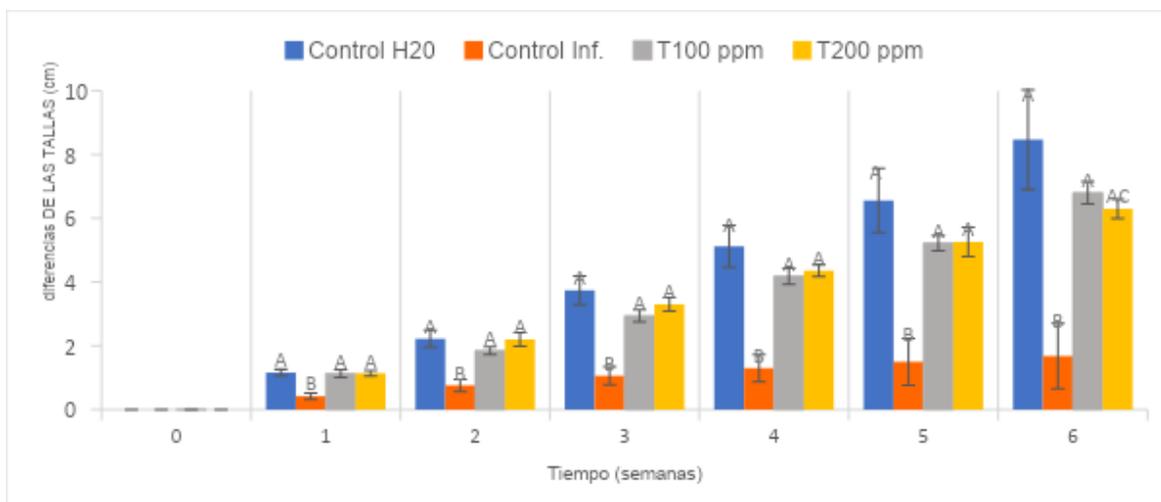


Figura 18. Evaluación del crecimiento de las plántulas asperjadas con soluciones de nitrato de plata a 100 ppm y 200 ppm. Letras diferentes $p \leq 0.05$. Análisis estadístico realizado con Tukey.

Se realizó un segundo experimento para observar el efecto del hongo en el crecimiento de las plantas de maíz, en este se observó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el crecimiento de las plantas respecto al control de agua y a los tratamientos; con estos resultados se demuestra que el fitopatógeno afecta el crecimiento de las plantas de maíz infectadas.

7.7.2 Brotes de hojas y hojas secas.

La pérdida de hojas en las plantas de maíz a causa de la infección por *B. zeae* es una de las características más peligrosas, ya que al secarse las hojas existe mayor posibilidad de la pérdida total de la planta. En este experimento se evaluó si el nitrato de plata podía generar ese efecto nocivo para el correcto desarrollo de la planta, identificando si brotaban hojas nuevas o inducía la desecación de las mismas.

En la *Fig 19*, se observa una hoja de una planta control, totalmente sana (*Fig. 19 A*), una hoja con sintomatología de infección por fitopatógeno del género *Bipolaris* con un tizón de color marrón en las hojas (*Fig. 19 B*). Hoja de una planta asperjada con nitrato de plata a 100 ppm presentando una coloración diferente, pero solo apareció en esa hoja de las 5 plantas tratadas (*Fig. 19 C*). Hojas sanas después de agregar nitrato de plata a 200 ppm por aplicación foliar (*Fig. 19 D*). Las manchas

marrones a menudo aparecen en las hojas medias e inferiores del dosel de la planta. Los primeros síntomas en las hojas fueron manchas pequeñas de 1 a 3 mm, marrones y acuosas que luego aumentaron 5 a 8 mm, corroborando la sintomatología de infección descrita en Zhao *et al.*, (2017).

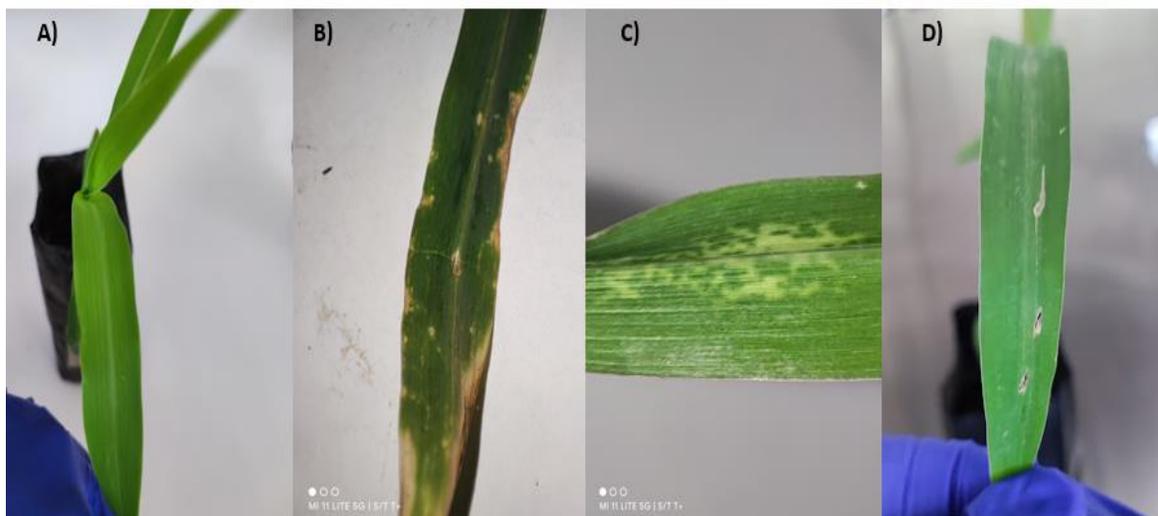


Figura 19. Infección por *B. zeae*. A) Hoja sana Control H₂O. B) Hoja Infectada (Control Inf.). C) Hoja tratada con 100 ppm de AgNO₃ (T100 ppm). D) Hoja tratada con 200 ppm de AgNO₃(T200 ppm)

En la *Fig. 20* se muestra que no existe una diferencia significativa $p > 0.05$ en el brote de hojas de las plantas del Control H₂O y las plantas de los tratamientos (T100 ppm) y (T200 ppm). El valor de $p \leq 0.05$ existe entre los brotes del Control H₂O, los tratamientos con respecto a la pérdida de hojas del control de las plantas inoculadas (Control inf.) a partir de la semana 3 de evaluación, síntoma que nos confirma la infección considerando que el nitrato de plata no resulta nocivo en el desarrollo de la planta, continuando con su crecimiento y brotes de hojas.

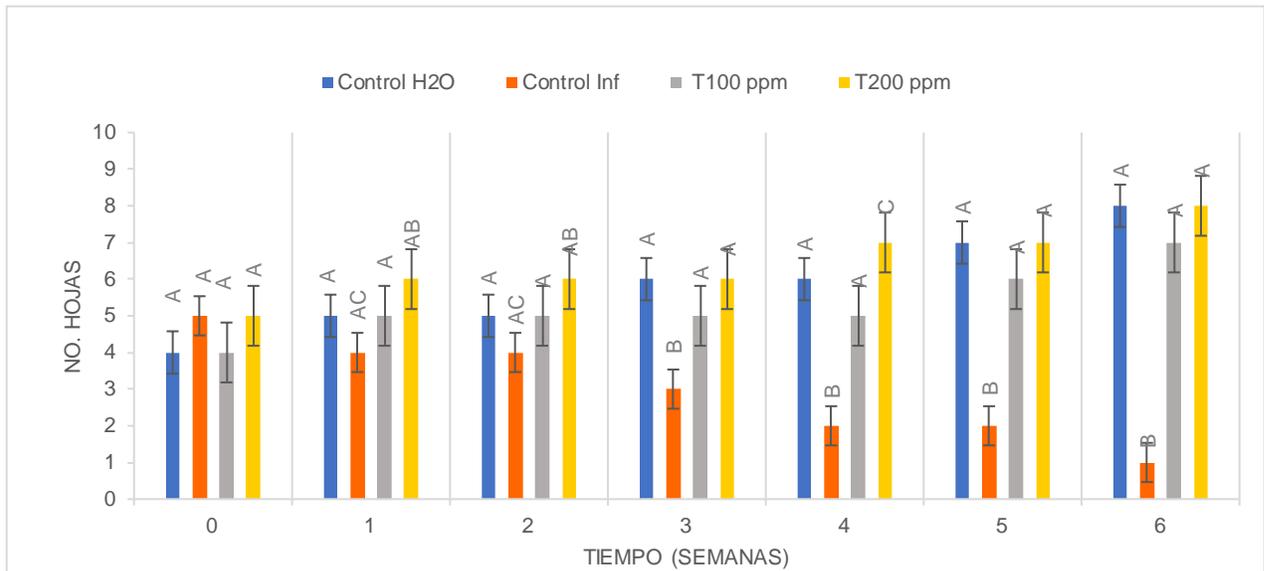


Figura 20. Evaluación de los brotes o pérdida de hojas en las plántulas asperjadas con nitrato de plata a 100 ppm y 200ppm. Letras iguales valor de $p > 0.05$ Letras diferente valor $p \leq 0.05$. Análisis estadístico realizado por ANOVA y Tukey.

7.8 Evaluación de la actividad antifúngica del nitrato de plata contra la infección de *B. zeae*.

La actividad antifúngica de la plata iónica o de nanopartículas tiene un gran potencial para su uso en el control de hongos patógenos vegetales productores de esporas. La plata puede ser menos tóxica para los humanos y los animales que los fungicidas sintéticos. Múltiples modos de acción dirigidos a una amplia gama de vías biológicas de los microbios proporcionan un beneficio importante para evitar el desarrollo de resistencia, que ha sido cada vez más importante en términos de problemas actuales para el manejo químico de muchas enfermedades fúngicas de las plantas, sin embargo, la eficacia de la plata está muy influenciada por el momento de la aplicación, las aplicaciones preventivas y las aplicaciones post inoculación. (Young ki -Jo *et al.* 2009).

7.8.1 Tratamiento preventivo in planta de *Z. mays*.

A) Crecimiento del tallo

El tratamiento preventivo se aplicó en las plántulas de *Z. mays*, 2 semanas previas a la inoculación, para evaluar la inhibición de la infección por *B. zea* y los efectos en el crecimiento.

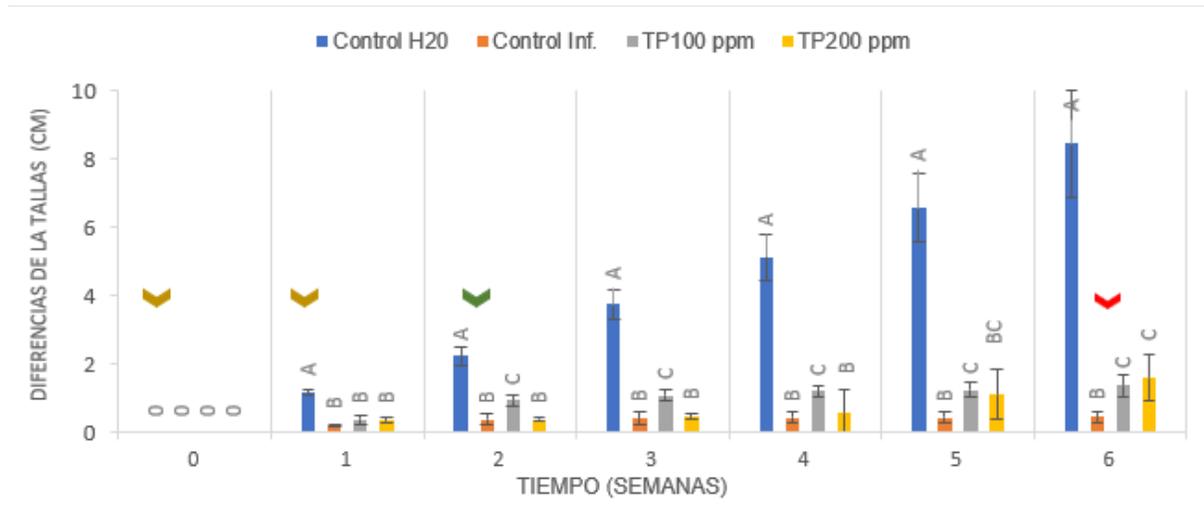


Figura 21. Evaluación del crecimiento de las plántulas en el tratamiento preventivo. Letras diferentes $p \leq 0.05$. Flecha color amarilla indica semanas de aplicación de tratamientos, color verde semana de inoculación. Análisis estadístico realizado con Tukey.

En la Figura 21. durante la semana 1 hay una diferencia significativa $p \leq 0.05$ entre las plantas control (Control H₂O) respecto a las plantas inoculadas (Control Inf), y con las plantas con los tratamientos de nitrato de plata, (TP100 ppm) y (TP200 ppm). En la semana 2, las plantas tratadas con AgNO₃ a 100 ppm comienzan a crecer haciendo una diferencia con las plantas inoculadas manteniendo un crecimiento lento hasta la semana 6. Las plantas tratadas con solución de nitrato de plata a 200 ppm (TP200 ppm) comienzan a crecer hasta la semana 5, siendo hasta la semana 6 una recuperación de ± 1.4 cm, generando una significancia $p \leq 0.05$ con las plantas infectadas, pero sin recuperar el crecimiento de una planta control.

B) Brotes de hojas y hojas secas.

Las hojas secas indican que la planta está infectada, en la Figura 22 se identifican que las plantas control que fueron asperjadas únicamente con agua desionizada (Control

H₂O) no tuvieron hojas secas, de lo contrario con el paso de las semanas tuvieron brotes. Las plantas inoculadas con conidios de *B. zeae* en la semana 0 iniciaron con 6 hojas y con el paso de las semanas se secaron 4 hojas. Las hojas de las plantas con el tratamiento preventivo (TP100 ppm) y (TP200 ppm) no perdieron la totalidad de sus hojas, pero el 50% de sus hojas se secó. Teniendo una diferencia significativa $p < 0.01$ con el Control H₂O respecto al control Inf. y los tratamientos debido al brote hojas.

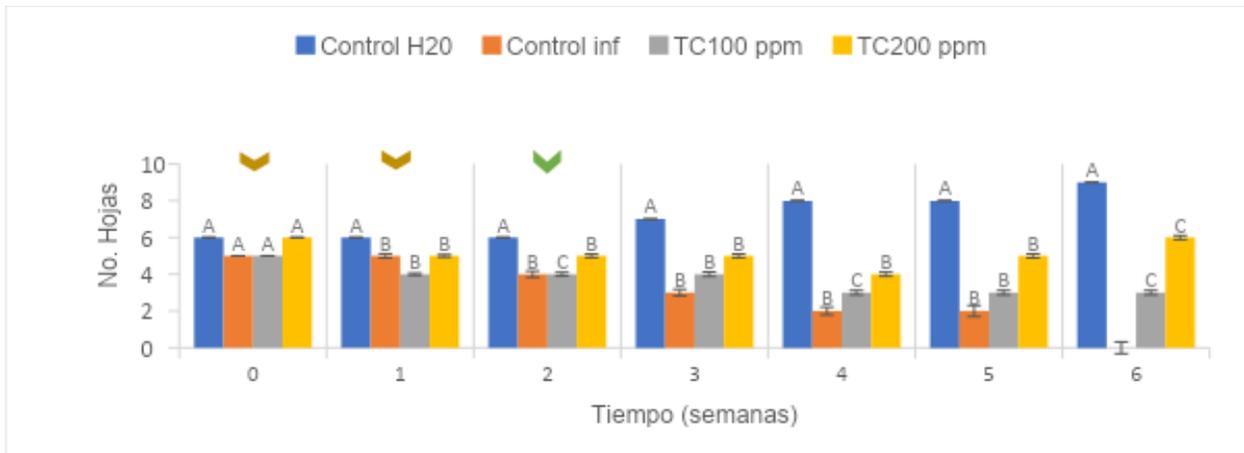


Figura 22. Evaluación de los brotes o pérdidas de hojas en las plántulas del tratamiento preventivo. Letras diferentes $p \leq 0.05$. Flecha color amarilla indica semanas de aplicación de tratamientos, color verde semana de inoculación. Análisis estadístico realizado con Tukey.

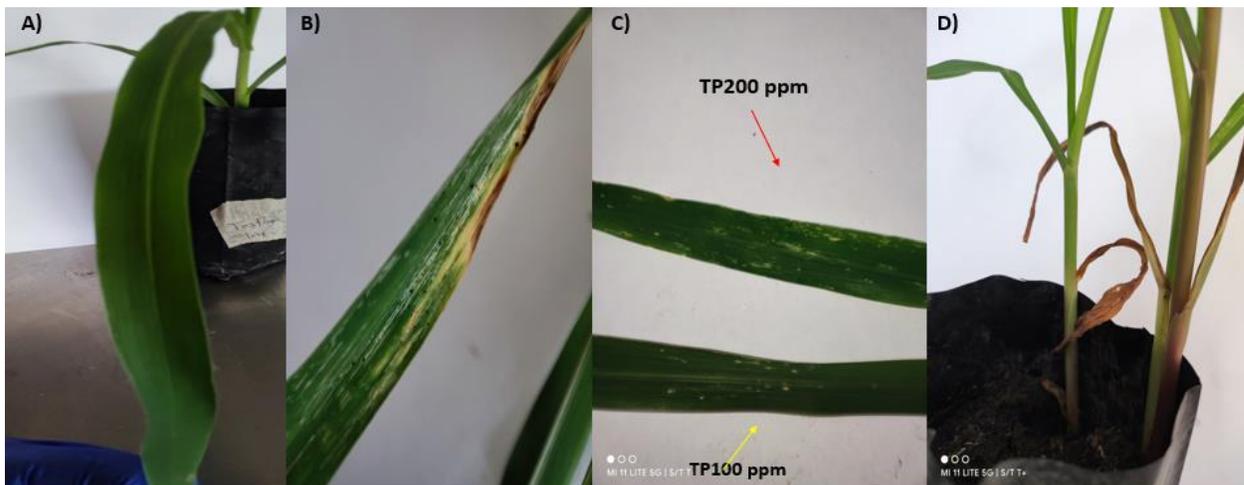


Figura 23. Tratamiento preventivo en plántulas de *Z. mays*. A) Hoja sana control asperjadas con agua desionizadas estéril. Fig. 23 B) Hoja Infectada con solución conidial de *B. zeae* Fig 23 C) Hojas con los respectivos tratamientos. D) Hojas secas durante al tratamiento

En la Figura 23. Se observan fotografías de A) Hoja sana control asperjadas con agua desionizadas estéril. Fig. 23 B) Hoja Infectada con solución conidial de *B. zeae* Fig 23

C) Hojas tratadas con tratamiento preventivo 100 ppm y 200 ppm de AgNO_3 y posteriormente inoculadas. Fig. 24 D) Hojas secas de plántulas tratadas con preventivo a 200 ppm.

7.8.2 Tratamiento correctivo *in planta* de *Z. mays*.

A) Crecimiento del tallo.

El tratamiento correctivo se aplicó en las plántulas de *Z. mays* 1 semana después de ser inoculadas, para evaluar la atenuación o corrección de la infección por *B. zea*e y los efectos en el crecimiento.

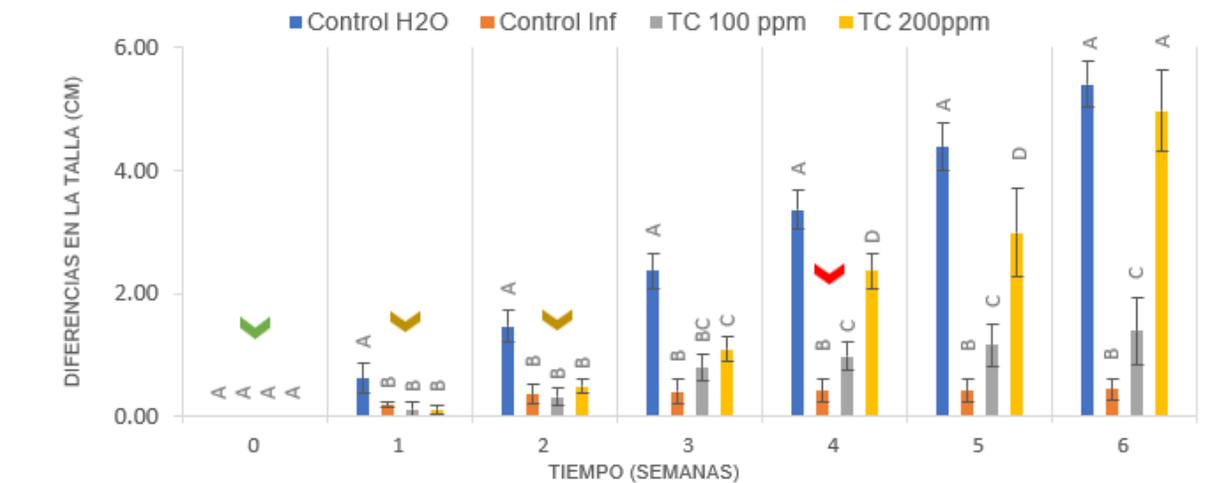


Figura 24. Evaluación del crecimiento de las plántulas en tratamiento correctivo. Letras iguales $p > 0.05$ Letras diferentes $p \leq 0.05$. Flecha color amarilla indica semanas de aplicación de tratamientos, color verde semana de inoculación, color rojo recuperación de crecimiento. Análisis estadístico realizado con Tukey.

En la *Fig. 24*, se observa un crecimiento constante de las plantas control (Control H₂O) con una diferencia significativa $p \leq 0.05$ respecto al control de plántulas inoculadas y las plantas del tratamiento correctivo. En la semana 4 las plantas inoculadas y posteriormente tratadas con las soluciones de nitrato de plata a 100 y 200 ppm recuperan su crecimiento haciendo una diferencia $p \leq 0.05$ con respecto a las plantas únicamente inoculadas con *B. zea*e. (control Inf). En la semana 5 y 6 las plantas del tratamiento correctivo 200 ppm (TC200 ppm), se recuperaron ± 4.2 cm. Posterior a la infección por el fitopatógeno, caso contrario en las plantas del tratamiento a 100 ppm (TC100 ppm) ya que no mueren, pero su crecimiento se detiene después de la semana 4.

B) Brotes de hojas y hojas secas.

En la *Fig. 25* se muestra la diferencia de hojas con respecto a la semana 0, debido a la infección las plantas tienden a perder hojas, es por ello que las plantas con tratamiento correctivo, es decir, aquellas que fueron inoculadas y posteriormente tratadas con nitrato de plata, pierden hojas como respuesta a la infección sin embargo mantienen más del 50% de las hojas iniciales. Teniendo en cuenta que las plantas en la semana 5 presentaron brotes de hojas nuevas.

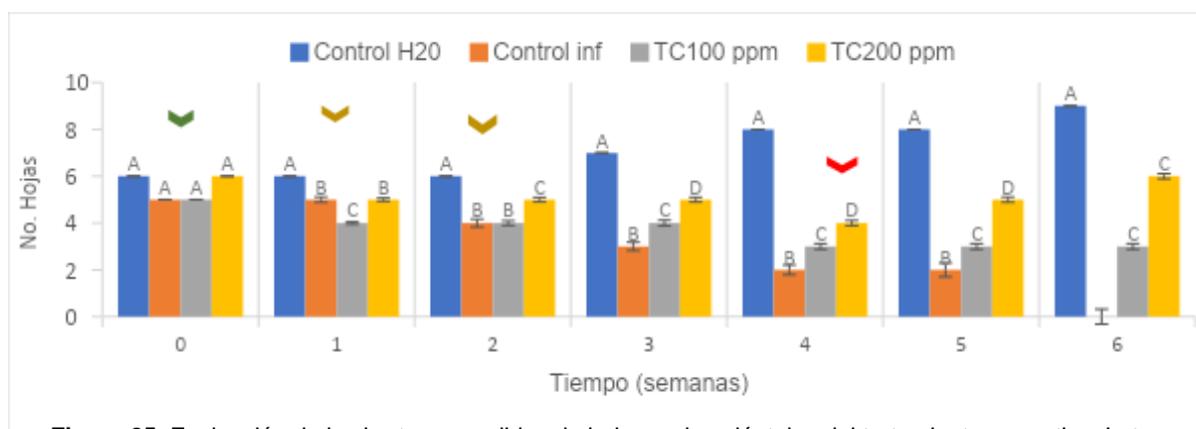


Figura 25. Evaluación de los brotes o pérdidas de hojas en las plántulas del tratamiento correctivo. Letras diferentes $p \leq 0.05$. Flecha color amarillo indica semanas de aplicación de tratamientos, color verde semana de inoculación, color rojo brote nuevo. Análisis estadístico realizado con Tukey.

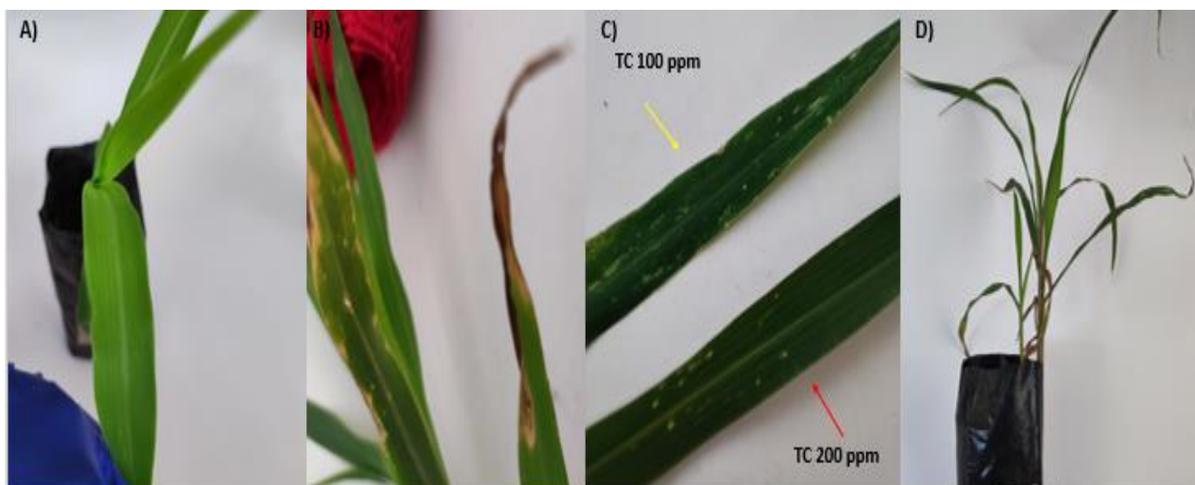


Figura 26. Tratamiento correctivo en plántulas de *Zea mays*. A) Planta sana B) Planta infectada C) Hojas post tratamiento D) Estado general de la planta post tratamiento 200 ppm.

En la Fig 26. Se aprecian fotografías para comparar los resultados de los tratamientos respecto a las plantas sanas e infectadas A) Hoja sana (Control H₂O). B) Hoja Infectada (Control Inf.). C) Hojas previamente inoculadas y posteriormente tratadas con 100 ppm y 200 ppm de AgNO₃. D) Plántula tratadas con correctivo a 200 ppm.

7.8.2 Tratamiento correctivo *in planta* *A. salmiana*.

Hojas o pencas

Las hojas (pencas) de los agaves están recubiertas con una capa cuticular que desempeña funciones relevantes, como: el intercambio gaseoso, control de los cambios de temperatura, como barrera contra patógenos, entre otros. Como bien se menciona las manchas grises o tizones de las cuales fue aislada la cepa de *Bipolaris zeae*, afectan ambas caras abaxial y adaxial de la hoja poniendo en peligro toda la planta de agave.

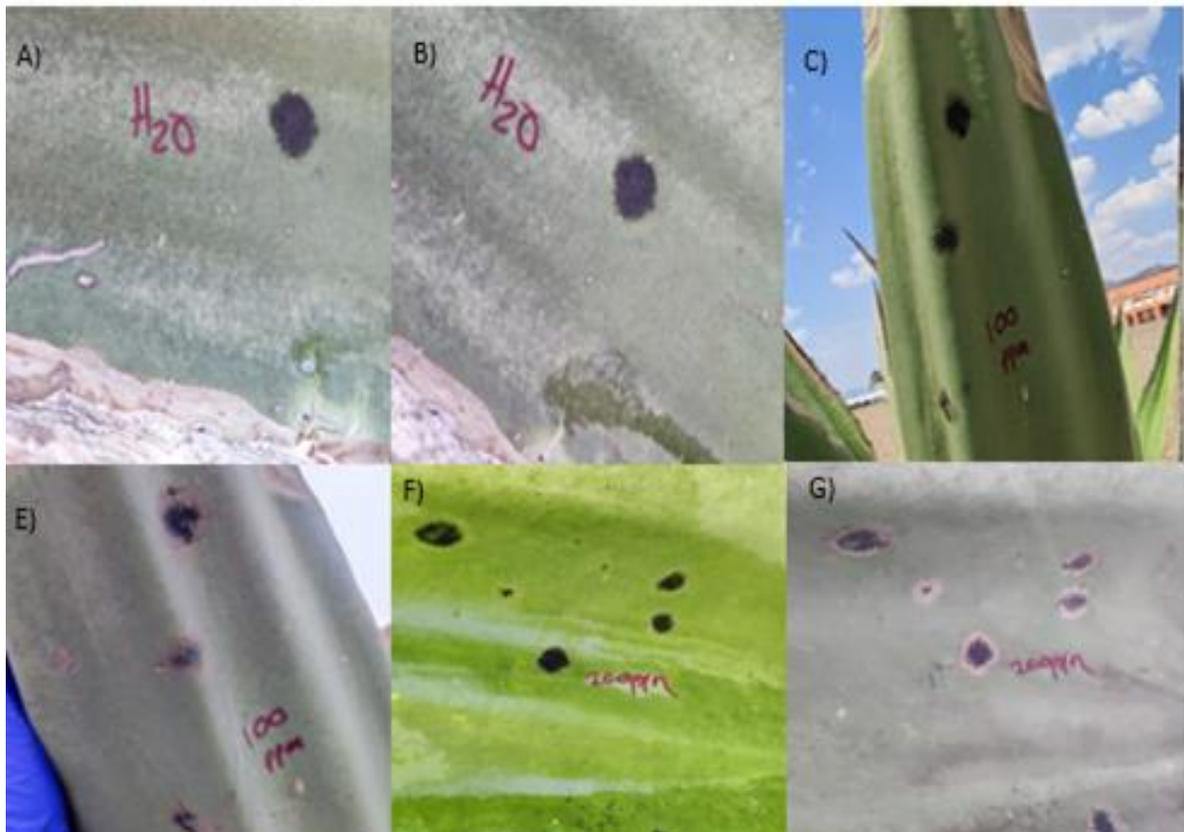


Figura 27. Evaluación antifúngica correctiva del AgNO₃ en *Agave salmiana* infectado. A) Tizón control (Semana 0). B) Tizón control (semana 4). C) Tizones TC100 ppm (semana 0). D) Tizones TC100 ppm (semana 4). F) Tizones TC200 ppm (semana 0). G) Tizones TC100 ppm (semana 4).

En la Figura 27 Se muestran fotografías de una de las lesiones foliares causadas por el fitopatógeno, lesión testada con agua (H₂O) toma de medida en semana 0 Medida del área de la lesión Foliar control en la semana 4 (Fig. 27 A y B). Tizón foliar tratado con solución acuosa de AgNO₃ a 100 ppm semana 0, Tizón foliar tratado con solución acuosa de AgNO₃ a 100 ppm semana 4 (Fig. 27 C y D.) Tizón foliar tratado con solución acuosa de AgNO₃ a 200 ppm semana 0. Tizón foliar tratado con solución acuosa de AgNO₃ a 200 ppm semana 4 (Fig. 27 E y F). Mostrando una disminución en el área de la lesión foliar, caracterizado por una halo de color café.

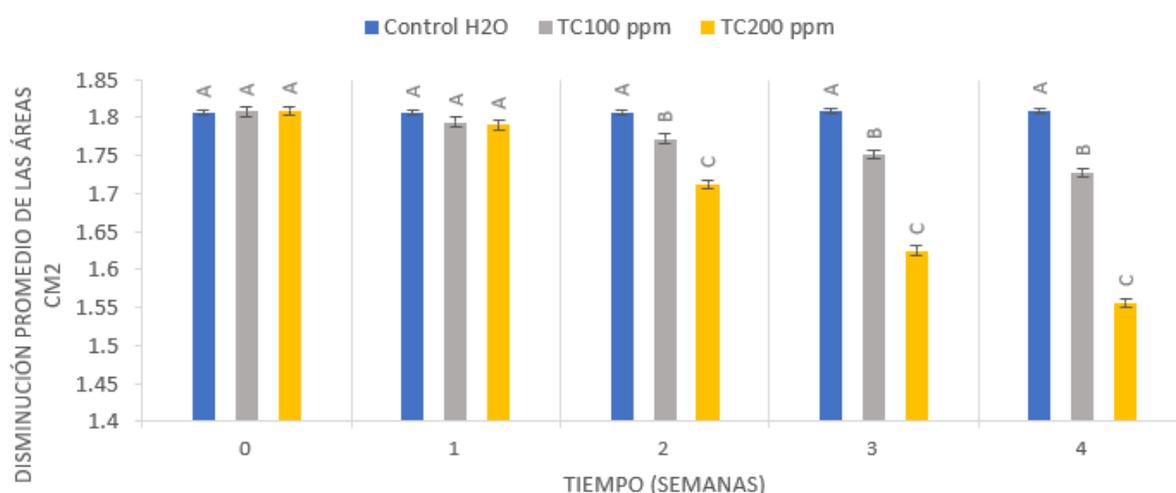


Figura 28. Evaluación de la actividad antifúngica correctiva del AgNO₃ en planta de *A. salmiana* infectada. Letras diferentes p≤0.05. Análisis estadístico realizado por Tukey.

En la Figura 28, se describe que durante la semana 0 y 1 después de aplicar ambos tratamientos y el control no existe diferencia significativa en la disminución del área de los tizones o manchas foliares seleccionadas. En la semana 2 hubo un promedio de disminución de 4.32% del área de los de los tizones asperjados con TC100 ppm, y un 7.46% de los asperjados con TC200 ppm con respecto al control (H₂O). En la semana 3 las manchas tratadas con 100 ppm disminuyeron 1.08% y los tratados con 200 ppm disminuyeron 4.97% más respecto a la semana anterior. Finalizando en la semana 4 con una reducción promedio de 7.02% para las manchas

tratadas con TC100 ppm y 16.21% para las tratadas con TC200 ppm, logrando un valor de $p \leq 0.05$ en la última semana con el tratamiento correctivo a 200 ppm.

8. CONCLUSIONES

La síntesis extracelular de nanopartículas de plata por medio del sobrenadante *Leuconostoc mesenteroides* no logró concretarse debido a que la forma y el tamaño de las bsAgNPs no eran consistentes y al probar su actividad antifúngica *in vitro* se determinó que el verdadero agente inhibidor de germinación era el nitrato de plata 0.6M (~100,000 ppm), debido a las altas concentraciones utilizadas

Debido a las concentraciones excesivas y tóxicas del nitrato de plata se determinó que las concentraciones mínimas inhibitorias del nitrato de plata son las mayores o iguales a 100 ppm. respecto a la germinación de los conidios de *B. zeae*.

Se determinó que la concentración a 200 ppm de AgNO₃ al evaluar su actividad antifúngica *in vitro* causa una inhibición total en la germinación de las esporas de *B. zeae*. Mientras que en 100 ppm sólo germinan en etapa inicial.

Las concentraciones de nitrato de plata utilizadas se encuentran dentro de los límites establecidos en la norma NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 para la tierra con uso de suelo agrícola.

En medio PDA con las mismas concentraciones de nitrato de plata y un control se obtuvo una inhibición de crecimiento de más del 65% a 200 ppm y 60% a 100 ppm.

En las pruebas preliminares para evaluar los posibles efectos tóxicos del nitrato de plata en las plantas de maíz se determinó que el crecimiento de las plántulas no se ve interrumpido o disminuido y no hay pérdida de hojas en el tratamiento a 100 ppm, caso contrario a 200 ppm que hay una pérdida del 10% de las hojas, pero debido a las condiciones, se puede considerar que la desecación de las hojas sucediera por factores externos ambientales o condiciones intrínsecas de la planta.

El tratamiento preventivo en plantas de *Z. mays*, se observó que el crecimiento del tallo con respecto al control es demasiado lento llegando a detenerse a partir de

la semana 4 sin que la planta no se seca en su totalidad, sin embargo, al no crecer y perder el 50% de sus hojas el desarrollo de la planta se ve afectado. Concluyendo que la actividad antifúngica preventiva con ambos tratamientos no es una opción viable.

El tratamiento correctivo con el tratamiento a 100 ppm recuperó su crecimiento lentamente y la pérdida de hojas fue menor al 30%. Por otra parte, las plantas tratadas con nitrato de plata a 200 ppm recuperaron su crecimiento llegando a competir con las plantas control, en las primeras semanas se secaron 2 hojas, pero se recuperan en la semana 5 y 6 con 2 brotes de hojas, concluyendo que se revierten los daños causados por el hongo a la semana 4.

El tratamiento correctivo en *A. salmiana* presenta una disminución en el área de las manchas foliares. Presenta una disminución de 17% a 200 ppm y 7% a 100 ppm.

Concluyendo que el tratamiento correctivo con nitrato de plata en bajas concentraciones resulta ser una alternativa contra el hongo aislado de la mancha negra de la enfermedad de la negrilla, asegurando que si las plantas de maíz se infectan y se identifica la enfermedad durante las primeras semanas hay probabilidades de que al aplicar el tratamiento TC 200 ppm se puedan revertir los daños y la planta pueda recuperarse una semana después de ser tratada, teniendo en consideración que las cantidades de plata iónica que pueden acumularse en las hojas o raíces son mínimas debido a la concentración utilizada.

9. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO.

Dentro de los estudios realizados sobre el agente causal de la enfermedad “negrilla” o “viruelilla” en *A. salmiana* se ha confirmado la presencia de dos fitopatógenos *B. zea* y *C. lunata* en estudios diferentes, pertenecientes al complejo *Cochliobulus*, *Bipolaris* y *Curvularia*, sin embargo, aún no se ha determinado la presencia de ambos géneros en las lesiones foliares de agaves contaminados, para confirmar el protagonismo de este complejo como agente causal.

Aún quedan varios puntos que deben aclararse sobre el implemento de nanopartículas sintetizadas extracelularmente para medir la eficacia para la inhibición de la germinación de las esporas de este fitopatógeno, además, de probar su efectividad *in planta*.

El nitrato de plata en solución acuosa resulta de ser una alternativa eficaz para la inhibición y disminución de la infección de diversos fitopatógenos incluido *B. zea* y bacterias; al aplicarse como tratamiento en plantas de consumo humano y animal se desconoce si los productos obtenidos del *A. salmiana* y *Z. mays*, mantengan su calidad después de ser tratados con la solución de dicho compuesto, se recomienda hacer una valoración en la calidad de los productos, además, de realizar pruebas que confirmen o descarten la presencia de iones de plata en dichos productos para determinar si existe algún riesgo en el consumo.

Confirmar el papel de agente infeccioso de *B. zea* en plantas de cebada, trigo o arroz debido a que estas especies de gramíneas son las que mayor incidencia reportan en casos de infección por agentes del género *Curvularia* o *Bipolaris*, a nivel mundial.

10. REFERENCIAS

Álvarez Duarte, M. D. C. (2016). Conocimiento tradicional, producción y manejo del maguey pulquero en Puebla y Tlaxcala [Tesis de maestría.]. Colegio de postgraduados institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas campus montecillo.

ASERCA 2018. Maíz grano cultivo representativo de México. gov.mx. <https://www.gob.mx/aserca/articulos/maiz-grano-cultivo-representativo-de-mexico>

Bay, Constanza, González, Tamara, Muñoz, Gonzalo, Legarraga, Paulette, Vizcaya, Cecilia, & Abarca, Katia. (2017). Feohifomicosis nasal por *Curvularia spicifera* en un paciente pediátrico con neutropenia y leucemia mieloide aguda. *Revista chilena de infectología*, 34(3), 280-286. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000300014>

Becerra, L. (1988). El pulque, ancestral bebida obtenida del árbol de las maravillas. Nueva antropología. Asociación Nueva Antropología. A. C. 10 (34): 195-198.

Becerril, E. (2015). Maguey el árbol maravilla. *garceta, órgano informativo oficial de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.*, 1(54), 2-4. <https://www.uaeh.edu.mx/>

Campaña manejo fitosanitario de cultivos perennes en Guanajuato, México. http://www.cesaveg.org.mx/html/folleto/folleto_11/folleto_agave_11.pdf

Cardona, R., & González, M. S. (2006). Técnicas para la preservación e inducción a la esporulación de hongos del complejo *Helminthosporium*. *Fitopatología Venezolana*, 19(1), 19-20.

CESAVEG (2007). Campaña de manejo Fitosanitario de Agave.

CESAVEG. 2008. Manual de plagas y enfermedades del Agave.

CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, ME). 2004. Programa de Maíz CIMMYT Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. 4 ed. México, D.F. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=+Programa+de+Ma%C3%ADz+CIM

[MYT+Enfermedades+del+ma%C3%ADz:+una+gu%C3%ADa+para+su+identificaci%C3%B3n+en+el+campo&publication_year=2004](#)

CONABIO. (2016). México, Tierra de magueyes. <http://www.biodiversidad.gob.mx/Difusion/carteles/carteles.html>. Cartel consultado en agosto 2023. Consultado en agosto 2018.

CONABIO. (2022). Razas de maíz de México | Biodiversidad Mexicana. Biodiversidad Mexicana. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/razas-de-maiz>

Cruz Vasconcelos, S. T. (2019). Crecimiento y fisiología de maguey pulquero (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) OBTENIDO POR SEMILLA [Tesis de maestría.]. Colegio de postgraduados. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas campus montecillo.

Cuervo-Parra, J.A., Romero-Cortes, T. and Aparicio-Burgos, J.E. (2023). Isolation and molecular identification of phytopathogenic fungi, associated with *Agave salmiana* and *Agave lechuguilla* plants with disease symptoms 'Negrilla', in the state of Hidalgo, Mexico. Consultado [17/01/2024]. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OR553112.1>

De Agricultura Y Desarrollo Rural, S. (s. f.). Pulque, una delicia mítica. gob.mx. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/pulque-una-delicia-mitica>

De Agricultura Y Desarrollo Rural, S. (s. f.-a). Pulque, bebida de dioses. . . gob.mx. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/pulque-bebida-de-dioses#:~:text=El%20pulque%20es%20tan%20famoso,%2C%20Tlaxcala%2C%20Morelos%20y%20Michoac%C3%A1n>.

Durán, N., Marcato, P. D., De Conti, R., Alves, O. L., Costa, F. T. M., & Brocchi, M. (2010). Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(6), 949-959. <https://doi.org/10.1590/s0103-50532010000600002>

Ertwein, S., Mira-Tapia, R. J. y Velasco-Pegueros, A. (2013). Proceso de elaboración del pulque, su importancia económica y concepción social en Apan, Hidalgo. In: Ejercicios etnográficos, aprendiendo a investigar. pp. 59-103.

Escalante, A., López Soto, D. R., Velázquez Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican

alcoholicfermented beverage: historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers inmicrobiology*, 7, 1026.

Feng, Q. L., 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*. *National Library of medicine*. Recuperado 6 de septiembre de 2023, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11033548/>

Fleitas Centurión¹, Adriana, & Grabowski Ocampos*¹, Cristhian J.. (2014). Control biológico del complejo de hongos causantes de la mancha foliar en maíz dulce (*Zea mays* var. *saccharata*) con bacterias benéficas. *Investigación Agraria*, 16(2), 83-92. Retrieved November 27, 2023, from http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2305-06832014000200002&lng=en&tlng=es.

Foolad, M. R., Ntahimpera, N., Christ, B. J., & Lin, G. Y. (2000). Comparison of Field, greenhouse, and Detached-Leaflet evaluations of tomato germ plasm for early blight resistance. *Plant Disease*, 84(9), 967-972. <https://doi.org/10.1094/pdis.2000.84.9.967>

Fouda, A.; Abdel-Maksoud, G.; Saad, H.A.; Gobouri, A.A.; Mohammedsaleh, Z.M.;

Gallego Albiach, V., & Pérez Igualada, L. M. (2008). Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento. *Universitat de València*. Recuperado 4 de agosto de 2023, de <https://riUNET.upv.es/bitstream/handle/10251/169378/GallegoPerez%20%20Estimacion%20de%20la%20Densidad%20Celular.pdf>

Garcés Fiallos, F. R., Aguirre Calderón, Ángel J., Liu-ba Delfini, G. A., & Carbo Morán, J. J. (2012). Severidad de curvularia en 67 líneas autofecundadas s4 de maíz amarillo. *Ciencia Y Tecnología*, 4(2), 39–44. <https://doi.org/10.18779/cyt.v4i2.107>

García Mendoza, A. J. (2011). Flora del valle de tehuacán-cuicatlán. Fascículo 88. AGAVACEAE, 1(88), 2-42. <http://www.ibiologia.unam.mx/>

García-Mendoza, A. J. (2007). Los agaves en México. Ciencias. (087)
Granados S.D. (1993). Los Agaves de México. México: Universidad Autónoma de Chapingo. 252 p.

Guerrero, A. G. (2022). Fitorremediación de suelos contaminados con arsénico, cobre y plomo empleando *Echeveria elegans* y *Crassula ovata*. <https://doi.org/10.24275/uama.6734.8738>

Hernández Díaz., M. P. (2013). “síntesis de nanopartículas de plata biológicamente asistida con opuntia sp. Y su incorporación en membranas poliméricas nanofibrosas” [Tesis de maestría]. Centro de investigación química aplicada.

Hernández José, J., Hernández Domínguez, E. M., López Vázquez, E., & Álvarez Cervantes, J. (2021). Aislamiento e identificación del fitopatógeno causal de viruela o “negrilla” en Agave salmiana de municipios del estado de Hidalgo, México. SCIENTIA FUNGORUM.

Holt, K. B., & Bard, A. J. (2005). Interaction of Silver(I) Ions with the Respiratory Chain of Escherichia coli: An Electrochemical and Scanning Electrochemical Microscopy Study of the Antimicrobial Mechanism of Micromolar Ag⁺. Biochemistry, 44(39), 13214–13223. doi:10.1021/bi0508542

<https://docplayer.es/7442632-Campana-de-manejo-fitosanitario-de-agave.html>.

Jung, W. K., Koo, H. C., Kim, K. W., Shin, S., Kim, S. H., & Park, T. (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology, 74(7), 2171-2178. <https://doi.org/10.1128/aem.02001-07>

Kaplan, A., Çiftçi, G. A., & Kutlu, H. M. (2015). Cytotoxic, anti-proliferative and apoptotic effects of silver nitrate against H-RAS transformed 5RP7. Cytotechnology, 68(5), 1727-1735. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9922-5>.

Kumar Pandian, S. R., Deepak, V., Kalishwaralal, K., Viswanathan, P., & Gurunathan., S. (2009). Mechanism of bactericidal activity of silver nitrate - A concentraton dependent bi functional molecule. *Brazilian Journal of Microbiology*.

Kumar, R., Hooda, K. S., Olakh, D. S., Kaur, H., Malik, V., & Kumar, S. (2013). Reaction of QPM inbred lines against Maydish Leaf Blight (MLB) and Charcol Rot. *Electronic Journal of Plant Breeding*, 4(4), 1280-1283.

Liau, S., Read, D., Pugh, W., Furr, J. R., & Russell, A. D. (1997). Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterialaction of silver ions. *Letters in Applied Microbiology*, 25(4), 279-283. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.1997.00219.x>

Logeswari, P., Silambarasan, S., & Abraham, J. (2015). Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(3), 311-317. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.04.007>

Lorenzo M. A. (2007). *Las haciendas pulqueras de México*. México: UNAM. Coordinación de Estudios de Posgrado.

Madrigal L. R., García M.E., Velázquez L.A. (2014). El maguey: cultivo y cultura. En Ramos Galicia Y. (Ed.), *El maguey y el pulque en la región central de México*. (pp.137-157). México: Gobierno del Estado de Tlaxcala. Fideicomiso Colegio de Historia de Tlaxcala.

Malik, V. K., Singh, M., Hooda, K. S., Yadav, N. K., & Chauhan, P. K. (2018). Efficacy of newer molecules, bioagents and botanicals against maydis leaf blight and banded leaf and sheath blight of maize. *The plant pathology journal*, 34(2), 121.

Manamgoda, D. S., Rossman, A. Y., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Madrid, H., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2014). The genus of bipolaris. *Studies in mycology*. <https://www.studiesinmycology.org>.

Mishra, S., Singh, B. R., Singh, A., Keswani, C., Naqvi, A. Z., & Singh, H. B. (2014). Biofabricated silver nanoparticles act as a strong fungicide against *bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease in wheat. PLOS ONE, 9(5), e97881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097881>

Mora-López, J. L., Kings-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B. y Aguirre-Rivera, J. R. (2011). Variación morfológica y humanización de la sección *Salmiana* del género *Agave*. *Agrociencia* 45: 465-477.

Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K. B., Kourí, J. B., Tapia-Ramírez, J., & Yacamán, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346-2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
name *Bipolaris* against *Cochliobolus* (Ascomycota: Pleosporales: Pleosporaceae).

Narváez Suárez, A. U. M., Martínez Saldaña, T., & Jiménez Velázquez, A. (2016). El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola*. Recuperado 10 de julio de 2023, de <https://www.redalyc.org/pdf/757/75749287005.pdf>

Paz, M. A., Goodwin, P. H., Raymundo, A., Ardales, E. Y., & Cruz, C. M. V. (2006). Phylogenetic analysis based on ITS sequences and conditions affecting the type of conidial germination of *Bipolaris oryzae*. *Plant Pathology*, 55(6), 756-765. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01439.x>

Pérez España, V. H., Cuervo Parra, J. A., Aparicio Burgos, J. E., Peralta Gil, M., Morales Ovando, M. A., & Romero Cortés, T. (2022). Importancia de la capa cuticular durante la colonización del hongo causante de la negrilla en *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp. *salmiana*. *Revista mexicana de ciencias forestales*. Recuperado 14 de abril de 2023, de <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i70.1265>

Piontelli Laforet, E. (2015). Especies oportunistas de importancia clínica de los géneros *Bipolaris* Shoemaker y *Curvularia* Boedijn: Su caracterización bajo los nuevos criterios taxonómicos. *Universidad de Valparaíso*. Recuperado 28 de octubre de 2023, de <https://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/348>

Producción de Maíz por País | Producción Agrícola Mundial 2023/2024. (2023) http://www.produccionagricolamundial.com/cultivos/maiz.aspx#google_vignette

Ramírez Manzano, S. I. (2015). *Conocimiento, etnotaxonomía y aprovechamiento del maguey pulquero en rancho San Isidro, Nanacamilpa, Tlaxcala, México*. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Revilla, P., Anibas, C. M., & Tracy, W. F. (2021). Sweet corn research around the world 2015–2020. *Agronomy*, 11(3), 534.

Rojas Avelizapa, N. G., Regalado Infante, P. E., Dávila Lezama, M. del R., Llarena Hernández, R. C., & Rojas Avelizapa, L. I. (2020). Actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata contra bacterias fitopatógenas. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 8(2), 1–7. <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v8i2.173>

Rojas-Avelizapa, N. G., Infante, P. E. R., Del Rosario Dávila Lezama, M., Hernández, R. C. L., & Avelizapa, L. I. R. (2020). Actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata contra bacterias fitopatógenas. *Revista biológico agropecuaria Tuxpan*, 8(2), 1-7. <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v8i2.173>

Romero-Cortes, T., Cuervo-Parra, J.A., Pérez-Espana, V.H., Pescador-Rojas, J.A., Rangel-Cortes, E. (2022). First report of leaf spot of *Agave salmiana* caused by *Bipolaris zea* in Mexico. Consultado [17/01/2024]. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/ON630344.1>

Ronquillo-de Jesús, Elba, Aguilar-Méndez, Miguel Angel, López-Perea, Patricia, Guzmán-Mendoza, José, Hernández-Martínez, Victoriano, Quiroz-Reyes,

Nathaly, Cruz-Hernández, Miguel Angel, & Ortiz-Balderas, Marineth. (2018). Synthesis of silver nanoparticles using aqueous tejocote extracts as reducing and passivating agent. *Ingeniería agrícola y biosistemas*, 10(2), 67-75. Epub 23 de mayo de 2022. <https://doi.org/10.5154/r.inagbi.2017.12.018>

Rossmann AY, Manamgoda DS, Hyde KD (2013a). Proposal to conserve the Rostro, B. R., Salazar, B. Q., Ramos-Elorduy, J., Moreno, J. M. P., Campos, S. C. Á., Pérez, Á. G., & García, V. (2012). Análisis químico y nutricional de tres insectos comestibles de interés comercial en la zona arqueológica del municipio de San Juan Teotihuacán y en Otumba, en el Estado de México. *Interciencia*, 37(12), 914-920. http://www.interciencia.org/v37_12/914.pdf

Rutala, W. A., Stiegel, M. M., Sarubbi, F. A., and Weber, D. J. 1997. Susceptibility of antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant bacteria to disinfectants. *Infect. Control*. 18:417-421. <https://doi.org/10.2307/30141249>.

Santiago, E. R., Bautista-Mayorga, F., & García-Salazar, J. A. (2022). Análisis del mercado de maíz en México desde una perspectiva de precios. *Acta Universitaria*, 32, 1-16. <https://doi.org/10.15174/au.2022.3265>

SENASICA. 2017. Plagas reglamentadas del agave. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/plagas-reglamentadas-del-agave-110851>
Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2021). Producción agrícola. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2016). Cultivo-Maguey pulquero Nacional y Estado de México por municipio. Fecha de consulta 30/01/2018. Disponible en: http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2018). Maguey: un agave que nos provee diversos productos agroalimentarios nativos. Fecha de consulta 30/01/2018. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/articulos/maguey-un-agave-que-nos-provee-diversos-productos-agroalimentarios-nativos?idiom=es>.

Singh, M., Mehra, R., & Malik, V. K. (2018). Evaluation of maize genotypes against maydis leaf blight caused by *Bipolaris maydis* (Nisikado and Miyake) Shoemaker under artificial epiphytotic conditions. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 7(5), 1006-1013.

Sivanesan, A. (1987). Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum*, and their teleomorphs. *Mycol. Pap.* 158: 1-261. *Taxon* 62: 1331–1332.

Thombre, R., Shinde, V. D., Thaiparambil, E., Zende, S., & Mehta, S. (2016). Antimicrobial activity and mechanism of inhibition of silver nanoparticles against extreme halophilic archaea. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01424>

Torres, L., Casas, A., Vega, E., Martínez-Ramos, M. y Delgado-Lemus. A. (2015). Population Dynamics and Sustainable Management of Mescal Agaves in Central Mexico: *Agave potatorum* in the Tehuacán-Cuicatlán Valley. *Economic Botany* 69 (1): 26-41

Vargas Zuñiga, L., Rodríguez Ortega, A., Rodríguez Ortega, L. T., Callejas Hernández, J., & Ventura Hernández, A. (2018). CONOCIMIENTOS BÁSICOS DEL CICLO BIOLÓGICO DE *Acentrocne hesperiaris* (Lepidoptera: Megathymidae) [Kindle]. ISBN: 978-607-9260-23-1

Young-Ki Jo, Byung H. Kim, & Geunhwa Jung, (2009). Antifungal Activity of Silver Ions and Nanoparticles on Phytopathogenic Fungi.

Zhang D, Wang F, Zhao J, Sun J, Fu D, Liu K, Xue C. 2019. Virulence, molecular diversity, and mating type of *Curvularia lunata* in China. *Plant Disease* 103 (7), 1728-1737. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1857-RE>

Zhao, Y., Zhang, D. M., Zhang, L., Yu, X., Yu, H., Shi, K., & Gao, K. (2017). First report of brown spot on Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) caused by *bipolaris Zeae* in China. *Plant Disease*, 101(12), 2146. <https://doi.org/10.1094/pdis-01-17-0127-pdn>