

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Evaluación de nanopartículas de plata y peróxido de hidrógeno para contrarrestar la enfermedad Huanglongbing (HLB) en cítricos cultivados en Veracruz

Evaluation of silver nanoparticles and hydrogen peroxide to counteract Huanglongbing (HLB) disease in citrus trees grown in Veracruz

Authors/Autores: Juárez-Santillán, L. F., Arteaga-Pérez, B., López-García, S. A., Martínez-Reséndiz, G.

ID: e1801

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1801>

Received/Fecha de recepción: October 29th 2024

Accepted /Fecha de aceptación: May 09th 2025

Available online/Fecha de publicación: May 21th 2025

Please cite this article as/Como citar este artículo: Juárez-Santillán, L. F., Arteaga-Pérez, B., López-García, S. A., Martínez-Reséndiz, G. (2025). Evaluation of silver nanoparticles and hydrogen peroxide to counteract Huanglongbing (HLB) disease in citrus trees grown in Veracruz. *Revista Bio Ciencias*, 12, e1801. <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1801>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

Artículo original

Evaluación de nanopartículas de plata y peróxido de hidrógeno para contrarrestar la enfermedad Huanglongbing (HLB) en cítricos cultivados en Veracruz

Evaluation of silver nanoparticles and hydrogen peroxide to counteract Huanglongbing (HLB) disease in citrus trees grown in Veracruz

Nanopartículas de plata y peróxido de hidrógeno para control de HLB/ Silver nanoparticles and hydrogen peroxide for HLB control

Juárez-Santillán, L. F.¹ (0000-0001-7428-9693), Arteaga-Pérez B.¹, López-García, S. A.²
(0000-0002-6936-2590) y Martínez-Reséndiz G.^{3*} (0000-0002-5471-0092)

¹Universidad Tecnológica de Gutiérrez Zamora, carrera Agrobiotecnología Área Vegetal. Prolongación Dr. Miguel Patiño S/N, centro, 93556, México.

²Instituto Tecnológico Superior de Naranjos, Área de ciencias básica, Veracruz, México

³Laboratorio de Humedales y Sustentabilidad Ambiental, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Misantla, Veracruz, Km 1.8 Carretera a Loma del Cojolite, Misantla, Veracruz, México, 93821. Becario postdoctoral de la SECIHTI (Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación)

***Corresponding Author:**

[Georgina Martínez-Reséndiz](mailto:georgina.martinez.tecm@gmail.com), Laboratorio de Humedales y Sustentabilidad Ambiental, División de Estudios de Posgrado e Investigación/Instituto Tecnológico Superior de Misantla, Veracruz, Km 1.8 Carretera a Loma del Cojolite, Misantla, Veracruz, Mexico, 93821. Becario postdoctoral de la SECIHTI (Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación). Teléfono: (771) 130 0937. E-mail: georgina.martinez.tecm@gmail.com

RESUMEN

El Huanglongbing (HLB), conocido también como "enfermedad del dragón amarillo," es causado por la bacteria *Candidatus Liberibacter* y representa una de las mayores amenazas para la citricultura mundial, provocando importantes pérdidas económicas. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el uso de nanopartículas de plata (NpAg) como estrategia de control para el HLB en *Citrus latifolia* (limón persa). Se analizaron seis tratamientos experimentales: (1) T1: control sin tratamiento, (2) T2: peróxido de hidrógeno (H₂O₂), (3) T3: NpAg, (4) T4: NpAg + H₂O₂, (5) T5: NpAg + H₂O₂ + fertilización orgánica y (6) T6: NpAg + H₂O₂ + fertilización química. Los tratamientos T5 y T6 mostraron los mejores resultados, evidenciados por la aparición de nuevos brotes, una notable reducción del amarillamiento foliar y la ausencia de engrosamiento en la nervadura central, síntomas distintivos de la enfermedad. Estos hallazgos sugieren que la combinación de NpAg, H₂O₂ y fertilización presenta un alto potencial para el control del HLB. Sin embargo, es necesario validar estos tratamientos a mayor escala en cultivos comerciales de cítricos. Además, estudios futuros

deberían incluir análisis moleculares que corroboren la eficacia del enfoque propuesto en la supresión o erradicación de *Candidatus Liberibacter*.

PALABRAS CLAVE:

Nanopartículas de plata, HLB, peróxido de hidrógeno, limón persa y *Diaphorina citri*.

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB), also known as "yellow dragon disease", is caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter* and represents one of the greatest threats to global citrus production, causing significant economic losses. This study aimed to evaluate the use of silver nanoparticles (NpAg) as a control strategy for HLB in *Citrus latifolia* (Persian lime). Six experimental treatments were tested: (1) T1: control without treatment, (2) T2: hydrogen peroxide (H₂O₂), (3) T3: NpAg, (4) T4: NpAg + H₂O₂, (5) T5: NpAg + H₂O₂ + organic fertilization, and (6) T6: NpAg + H₂O₂ + chemical fertilization. Treatments T5 and T6 showed the best results, evidenced by the appearance of new shoots, a significant reduction in leaf yellowing, and the absence of thickening in the central leaf vein, which are characteristic symptoms of the disease. These results suggest that the combination of NpAg, H₂O₂, and fertilization has a high potential for HLB control. However, it is necessary to validate these treatments at a larger scale in commercial citrus crops. Furthermore, future studies should include molecular analyses to confirm the efficacy of the proposed approach in suppressing or eradicating *Candidatus Liberibacter*.

KEYWORDS

Silver nanoparticles, HLB, hydrogen peroxide, Persian lemon, and *Diaphorina citri*

Introducción

El Huanglongbing (HLB), también conocido como "enfermedad del enverdecimiento de los cítricos" (Noorizadeh *et al.*, 2022) es una de las principales amenazas para la citricultura a nivel mundial. Esta enfermedad, causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* y transmitida por el psílido vector *Diaphorina citri* (Boina & Bloomquist, 2015; Pérez-González *et al.*, 2022; Ladaniya, 2023), representa un serio desafío para la producción de cítricos debido a los graves síntomas que provoca. Cuando las plantas son infectadas, la enfermedad se distribuye de manera heterogénea en el floema, afectando la nervadura central de las hojas, las raíces, las flores y los frutos (Robles-González *et al.*, 2013). Las hojas jóvenes muestran manchas verdes pálido, clorosis con venas verdes y engrosadas, mientras que las raíces presentan pudrición y el dosel se reduce notablemente. En los frutos, el HLB causa caída prematura, coloración verde persistente en la base, sabor amargo y deformaciones, incluyendo semillas abortadas y tamaños reducidos y la floración suele ser temprana y presenta amarillamiento (Thakuria *et al.*, 2023).

En México, donde se produce el 14 % de los cítricos a nivel mundial, esta enfermedad tiene un impacto considerable en regiones como Veracruz, uno de los principales estados productores. La presencia de HLB en esta zona está afectando la producción y economía

regional de forma significativa (Hernández-Landa *et al.*, 2017). Ante esta situación, los citricultores han implementado estrategias como la aplicación de fertilizantes adicionales, aspersiones foliares enriquecidas con micronutrientes y productos químicos para inducir respuestas inmunológicas en las plantas. Sin embargo, estos esfuerzos han mostrado resultados limitados, lo que ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para controlar la enfermedad (Ghosh *et al.* 2022).

En este contexto, las nanopartículas de plata (NpAg) han emergido como una posible solución debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas excepcionales, así como a su conocida actividad antimicrobiana (Zhang *et al.*, 2016). Estas nanopartículas han sido ampliamente estudiadas por su uso como agentes bactericidas y fungicidas, especialmente en aplicaciones biotecnológicas (Khaydarov *et al.*, 2009). Por otro lado, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) también ha demostrado ser un compuesto clave en las plantas, actuando como molécula de señalización, mitigador de estrés y reforzador de la pared celular (Gill & Tuteja, 2010; Ahmad 2014). Además, el H₂O₂ interactúa con reguladores de crecimiento vegetal como auxinas, giberelinas y brasinoesteroides, lo que le confiere un papel importante bajo condiciones de estrés ambiental (Liheng *et al.*, 2009; Mittler *et al.* 2011; Dietz *et al.*, 2016; Nazir *et al.*, 2020).

En este trabajo, se propone el uso combinado de nanopartículas de plata y peróxido de hidrógeno como una estrategia innovadora para contrarrestar el HLB en cultivos de cítricos, específicamente en limón persa (*Citrus x latifolia*) cultivado en Veracruz. Este trabajo busca evaluar la efectividad de estas herramientas para reducir el impacto de la enfermedad, con el objetivo de contribuir al desarrollo de una alternativa viable para la erradicación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* y la protección de la citricultura mexicana.

Material y Métodos

Zona de estudio

El estudio se llevó a cabo en la zona experimental de la Universidad Tecnológica de Gutiérrez Zamora, conocida como "El Cocotero," ubicada en las coordenadas geográficas 20.48° N y 97.09° O (Figura 1). Esta región se caracteriza por un clima cálido y húmedo, con diferencias estacionales bien marcadas. Durante la temporada de lluvias, el clima es predominantemente caluroso y mayormente nublado, mientras que en la temporada de sequía es cálido, húmedo y parcialmente nublado. La temperatura anual oscila entre los 17 °C y los 32 °C, con valores extremos poco frecuentes que descienden por debajo de los 14 °C o superan los 35 °C. Además, la región registra un promedio anual de precipitación de 280 milímetros (INEGI, 2010).

Tratamientos realizados

Los tratamientos evaluados en plantas de limón persa (*Citrus x latifolia*) infectadas con HLB fueron distribuidos en seis grupos experimentales, descritos de la siguiente manera: 1) T1: agua de pozo como control negativo; 2) T2: peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0.3 % (v/v); 3)

T3: nanopartículas de plata (NpAg) a una concentración de 0.0685 ppm; 4) T4: combinación de H₂O₂ al 0.3 % y NpAg a 0.0685 ppm; 5) T5: combinación de H₂O₂ al 0.3 %, NpAg a 0.0685 ppm y fertilización orgánica (57 mL de té de compost); y (6) T6: combinación de H₂O₂ al 0.3 %, NpAg a 0.0685 ppm y fertilización química (80 g de fertilizante granulado con relación N-P-K de 17-17-17) (Figura 2a).

La metodología experimental, así como las condiciones de aplicación y periodicidad de los tratamientos, se encuentran detalladas en la Tabla 1. Los tratamientos fueron diseñados con el objetivo de evaluar el efecto individual y combinado de los compuestos aplicados, considerando tanto su acción antimicrobiana como su capacidad para mejorar la respuesta fisiológica de las plantas ante la infección por HLB.



Figura 1. Ubicación geográfica de Gutiérrez Zamora, Veracruz., sitio del ensayo experimental en plantas de limón (*Citrus x latifolia*) afectados por HLB.

Aplicación de los tratamientos en las plantas

Cada planta recibió la aplicación del tratamiento correspondiente en dos modalidades: a nivel radicular y vía foliar. Se administraron 50 mL de la solución tratante en la zona radicular, asegurando su absorción a través del sistema radicular, mientras que 116 mL fueron asperjados uniformemente sobre el follaje y el tallo, garantizando una adecuada cobertura de la superficie vegetal (Figura 2b). Esta metodología permitió evaluar la eficacia diferencial de los tratamientos en la mitigación del impacto de HLB en *Citrus x latifolia*.

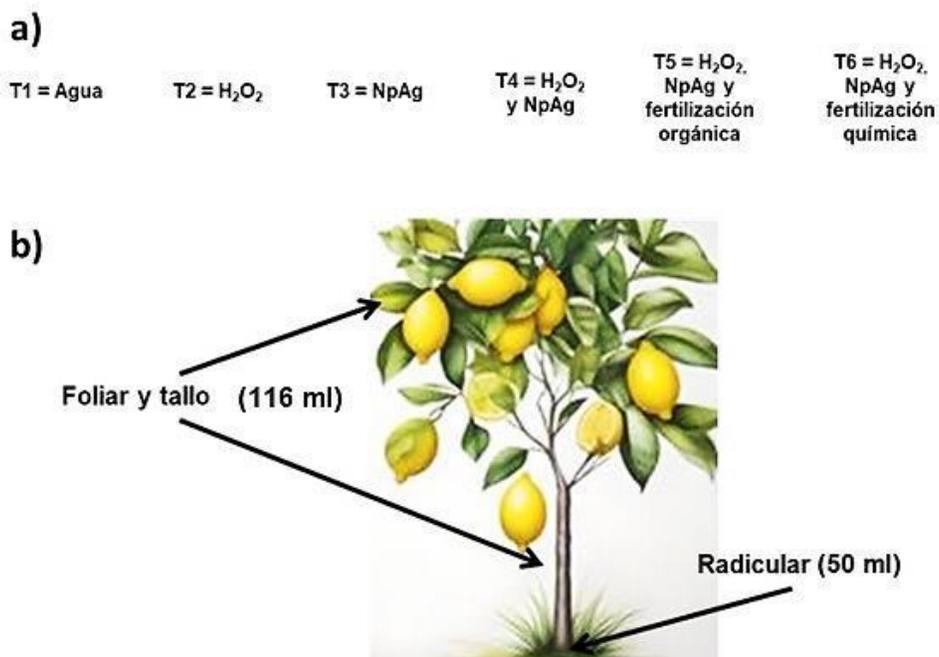


Figura 2. a) Tratamientos realizados en plantas de limón. b) Áreas de aplicación de tratamientos en las plantas de cítrico.

Síntesis de nanopartículas de plata

La síntesis de NpAg se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Frank et al. (2010), empleando ácido ascórbico como agente reductor, ácido cítrico como agente estabilizante y nitrato de plata (AgNO₃) como precursor de los iones plata (Ag⁺). El proceso de síntesis se desarrolló bajo condiciones controladas de temperatura y agitación para asegurar la reducción eficiente de Ag⁺ y la estabilización de las nanopartículas formadas.

Prueba presuntiva para la presencia de HLB

La detección presuntiva de HLB se llevó a cabo mediante la metodología propuesta por Takushi et al. (2007), basada en el uso de yodo como reactivo. Esta prueba cualitativa permite la identificación preliminar de la enfermedad a través de la reacción del almidón presente en las hojas con la solución de yodo, generando una coloración marrón característica en las nervaduras. La presencia de esta tonalidad se considera un indicativo positivo de infección por *Candidatus Liberibacter* spp., lo que permite discriminar plantas potencialmente afectadas para su posterior análisis confirmatorio mediante técnicas moleculares.

Periodicidad de aplicación

La aplicación de cada tratamiento se llevó a cabo conforme a lo especificado en la Tabla 1. El esquema temporal de aplicación fue diseñado con el objetivo de eliminar la presencia de

HLB en las plantas durante las primeras etapas del tratamiento. Las aplicaciones subsecuentes, realizadas cada 15 días, tuvieron la finalidad de fortalecer el estado nutricional de la planta y contribuir a la erradicación completa de *Candidatus Liberibacter spp.*

El monitoreo del desarrollo y respuesta de las plantas se realizó mediante un registro fotográfico sistemático (cámara, nikon). A partir de estas imágenes, se evaluaron y documentaron cambios fisiológicos y morfológicos, incluyendo modificaciones en la estructura de la nervadura, variaciones en la coloración foliar y la aparición de nuevos brotes, proporcionando así un análisis visual detallado del impacto de los tratamientos aplicados.

Tabla 1. Desarrollo de los tratamientos aplicados en las plantas

Semana	Aplicaciones	Días
1	2	Miércoles y viernes
2	2	Miércoles y viernes
3	1	Viernes
4	1	Viernes
5	0	Sin tratamiento
6	1	Viernes
7	0	Sin tratamiento
8	1	Viernes

El número de brotes nuevos fue cuantificado mediante conteo directo en cada planta. El monitoreo se llevó a cabo de forma semanal durante un periodo de ocho semanas, registrando el número total de brotes emergentes en cada tratamiento. Para evaluar la intensidad del verdor en las hojas, se utilizó un medidor SPAD (Soil Plant Analysis Development), el cual permite determinar el porcentaje de color verde a través del análisis visual y digital de las hojas. Este dispositivo mide la absorbancia de la luz en longitudes de onda específicas, lo que se correlaciona directamente con el contenido de clorofila en el tejido foliar (Uddling et al., 2007).

Adicionalmente, la altura de las plantas fue determinada utilizando una cinta métrica, midiendo la distancia desde la base del tallo hasta la punta del brote más alto. Estas mediciones fueron registradas al finalizar el experimento para evaluar el impacto de los tratamientos sobre el crecimiento vegetal (Habibullah et al., 2019).

Contenido de clorofila

El contenido de clorofila en las hojas se determinó mediante el método de extracción con acetona al 80 %, siguiendo el protocolo descrito por Arnon (1949). Para ello, se pesaron 0.5 g de tejido foliar fresco, los cuales fueron macerados en acetona a fin de facilitar la liberación de los pigmentos fotosintéticos. Posteriormente, la solución obtenida fue sometida a centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos para la separación de los componentes celulares. La cuantificación de la clorofila se realizó mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 645 y 663 nm, lo que permitió calcular las concentraciones de clorofila total, clorofila *a* y clorofila *b*, con base en las ecuaciones establecidas para este método.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados utilizando el software estadístico SPSS versión 26. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Posteriormente, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significancia del 5 % ($p < 0.05$) para identificar diferencias estadísticas entre los grupos experimentales.

Resultados y Discusión

En las plántulas de limón asignadas al tratamiento control (T1), en las cuales únicamente se aplicó agua de la llave, se observó una mejora en la coloración foliar. Sin embargo, no se evidenció una reducción en el engrosamiento de la nervadura ni la inducción temprana de brotes nuevos (Figura 3). Adicionalmente, una de las plantas presentó defoliación atribuida a daños ocasionados por insectos masticadores. La emergencia de nuevos brotes se registró únicamente al finalizar el experimento, transcurrido 35 días.

El tratamiento 2, basado en la aplicación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), promovió significativamente la inducción de nuevos brotes. En promedio, cada planta desarrolló tres brotes dentro de las dos primeras semanas posteriores a la aplicación. Asimismo, se observó una mejora en la coloración foliar, indicando una posible optimización en la actividad fotosintética y el estado fisiológico de las plantas, como se ilustra en la Figura 4.

El tratamiento con NpAg (T3) promovió significativamente la inducción de nuevos brotes, registrándose un promedio de tres brotes por planta entre la primera y la segunda semana posterior a la aplicación (Figura 5). Se observó un caso de defoliación a los 13 días en una de las plantas tratadas; no obstante, esta mostró una recuperación acelerada con la emisión de nuevos brotes en el transcurso de una semana. En contraste, en el grupo control, una planta también presentó defoliación, pero sin evidenciar una recuperación comparable en el mismo periodo, lo que sugiere un efecto positivo de las NpAg en la regeneración del tejido vegetal.



Figura 3. Desarrollo de las plantas de T1 (Agua de la llave) a lo largo del estudio. Día 0, son plantas con un mes de desarrollo y tamaños aproximado de 40 cm. Los óvalos rojos marcan el área defoliada y el tiempo en el que apareció el nuevo follaje.



Figura 4. Plántula de limón del tratamiento 2. Los óvalos indican la mejoría en coloración de hoja, así como una disminución en la nervadura.



Figura 5. Plantas de limón del T. El óvalo rojo marca la zona defoliada de una planta, la cual mostró recuperación en menor tiempo que la del T1.

El tratamiento 4 (T4), que combinó la aplicación de NpAg con H_2O_2 , indujo efectos fisiológicos favorables en las plantas, evidenciados por la aparición de nuevos brotes a partir de la cuarta semana. Durante las tres primeras semanas, se observó una reducción progresiva en el engrosamiento de la nervadura y una mejora en la coloración foliar, lo que sugiere una recuperación estructural y funcional del tejido vegetal (Figura 6). A pesar de que una de las plantas tratadas presentó defoliación, su capacidad de regeneración fue notablemente superior a la del grupo control, donde no se registró una recuperación comparable. Además, en la Figura 6 se observa que las tres plantas sometidas a este tratamiento desarrollaron un follaje homogéneo, lo que indica una respuesta uniforme y efectiva al protocolo aplicado.



Figura 6. Plántula de limón del T3. El óvalo rojo marca la zona defoliada de una planta, la cual mostró recuperación en menor tiempo que la del T1.

El tratamiento 5 (T5), basado en la aplicación combinada de NpAg, H₂O₂ y fertilización orgánica con infusión de compost, mostró una respuesta fisiológica favorable en las plantas tratadas, acelerando significativamente la aparición de nuevos brotes. La regeneración vegetal se evidenció en un periodo de 10 días posteriores a la fertilización, incluso en aquellas plantas que presentaron daños mecánicos, lo que sugiere un efecto entre los componentes del tratamiento. Estos resultados destacan el potencial de la combinación de NpAg, H₂O₂ y fertilización orgánica en la mejora del vigor y recuperación de las plantas afectadas. La Figura 7 muestra la respuesta positiva de las plantas a este tratamiento, confirmando la eficacia de la estrategia aplicada.

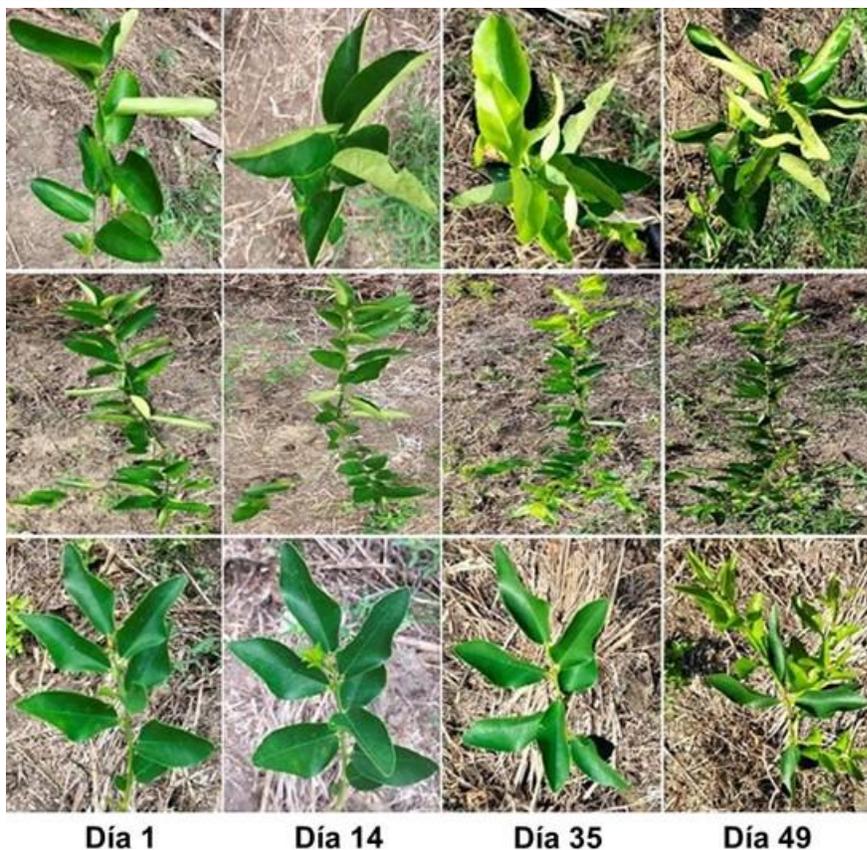


Figura 7. Plántula de limón con T4.

El tratamiento 6 (T6), que consistió en la aplicación combinada de NpAg, H₂O₂ y fertilización química granulada (de liberación rápida se disuelven fácilmente, mientras que los de liberación lenta poseen recubrimientos que regulan la disponibilidad de nutrientes, reduciendo pérdidas por lixiviación (González et al., 2005), indujo una respuesta fisiológica positiva en las plantas tratadas. Se observó un aumento significativo en la generación de nuevos brotes, acompañado de una reducción progresiva en el engrosamiento de la nervadura y una intensificación en la coloración foliar, lo que sugiere una recuperación más eficiente en comparación con los demás tratamientos evaluados (Figura 8). Estos resultados indican que la sinergia entre los compuestos aplicados contribuye a la restauración de la funcionalidad vegetal y al fortalecimiento estructural de las plantas. La Figura 8 ilustra la formulación del tratamiento y sus efectos sobre el crecimiento y vigor de las plantas, destacando su potencial como estrategia para la recuperación de cítricos afectados.

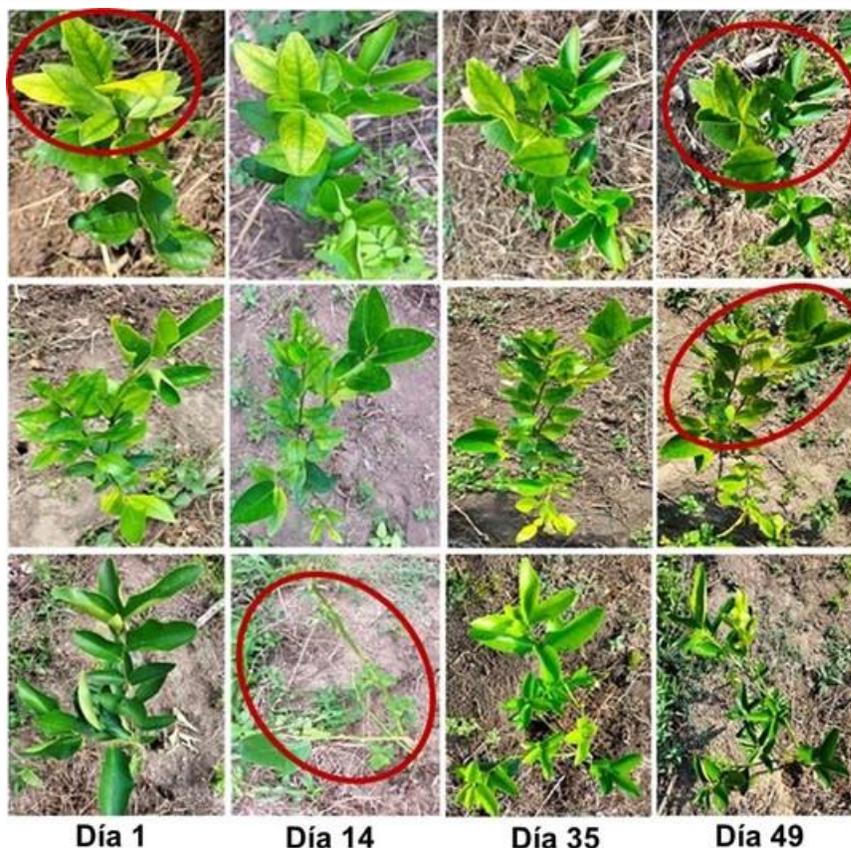


Figura 8. Plántula de limón con tratamiento 5 (T5). El tratamiento consistió en la mezcla de NpAg + H₂O₂ + fertilización química granulada (0.3 %). El óvalo rojo marca la zona defoliada de una planta.

Pruebas presuntivas de detección de HLB

Para determinar la presencia de HLB en las plantas, se realizó la prueba presuntiva de yodo, un ensayo cualitativo basado en la detección de coloración marrón en las nervaduras de las hojas, lo que indica la acumulación de almidón como respuesta a la infección. Esta prueba, con una confiabilidad del 80 % (Takushi et al., 2007), permitió evaluar la presencia o ausencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. al inicio y al final del experimento (Figura 9).

Al inicio del estudio, todas las plantas de los diferentes tratamientos mostraron resultados positivos para la presencia de HLB. No obstante, tras 60 días de evaluación, se observaron variaciones en los resultados, sugiriendo un impacto diferencial de los tratamientos aplicados. En particular, la combinación de NpAg con H₂O₂ y fertilización mostró una reducción significativa en la positividad de la prueba, lo que indica un efecto potencialmente inhibitorio sobre la bacteria. La disminución progresiva en los resultados positivos al finalizar el estudio resalta la eficacia de estas estrategias para mitigar la enfermedad, posicionándolas como una alternativa prometedora para el manejo del HLB en cultivos cítricos.

Los resultados de la prueba presuntiva de yodo para la detección de HLB fueron los siguientes (Tabla 1):

Tabla 2. Resultados obtenidos de los diferentes tratamientos

Tratamiento	Descripción	Plantas Positivas al Inicio	Plantas Positivas al Final
T1 (Control)	Sin tratamiento	3/3	3/3
T2 (H ₂ O ₂)	Peróxido de hidrógeno	3/3	2/3
T3 (NpAg)	Nanopartículas de plata	2/3	1/3
T4 (NpAg + H ₂ O ₂)	Nanopartículas de plata + Peróxido de hidrógeno	3/3	2/3
T5 (NpAg + H ₂ O ₂ + Fert. Orgánica)	Nanopartículas de plata + Peróxido de hidrógeno + Fertilización orgánica	2/3	1/3
T6 (NpAg + H ₂ O ₂ + Fert. Química)	Nanopartículas de plata + Peróxido de hidrógeno + Fertilización química	3/3	0/3

Estos resultados sugieren que la combinación de NpAg, H₂O₂ y fertilización adecuada tiene un impacto positivo en la reducción de la incidencia de HLB, destacando su potencial como estrategia de manejo para esta enfermedad en cítricos.

Con la finalidad de eliminar la enfermedad HLB, diversas estrategias han sido evaluadas con el fin de mitigar su impacto en los cultivos cítricos. Entre las opciones más exploradas se encuentra la eliminación de árboles infectados, un método que, aunque disminuye la tasa de avance anual de la enfermedad, no cuenta con una aceptación generalizada debido a los costos asociados y a los efectos ecológicos adversos que genera (Bassanezi et al., 2013). Otra línea de investigación se enfoca en el uso de activadores y antibióticos para inhibir el desarrollo de la enfermedad, logrando una reducción en la incidencia de HLB de hasta un 30 % y 36.6 %, respectivamente (Hu et al., 2018). Sin embargo, el uso continuo de antibióticos conlleva el riesgo de generar resistencia bacteriana, lo cual podría comprometer la eficacia a largo plazo de estos tratamientos (Zhang et al., 2014). Este problema, junto con los efectos adversos potenciales sobre la productividad de las plantas tratadas, resalta la necesidad de explorar alternativas menos propensas a generar efectos secundarios indeseados.

El presente estudio propone una estrategia innovadora basada en la aplicación combinada de NpAg, H₂O₂ y fertilización química, con el objetivo de controlar eficazmente el HLB. Los resultados obtenidos indican que las plantas tratadas con esta combinación mostraron una mejora significativa en su fisiología, destacándose por un desarrollo foliar superior y la ausencia de HLB en las pruebas presuntivas al final del experimento. En comparación con estudios previos, como los de Hu et al. (2018), en los que la aplicación de antibióticos y activadores logró reducir la incidencia de la enfermedad, el tratamiento combinado

propuesto en este trabajo mostró resultados aún más favorables, con las tres plantas evaluadas dando negativo en la prueba presuntiva de HLB. Esto sugiere que la combinación de NpAg y H₂O₂ podría ofrecer una alternativa más sostenible y efectiva para el control de la enfermedad en cultivos cítricos.

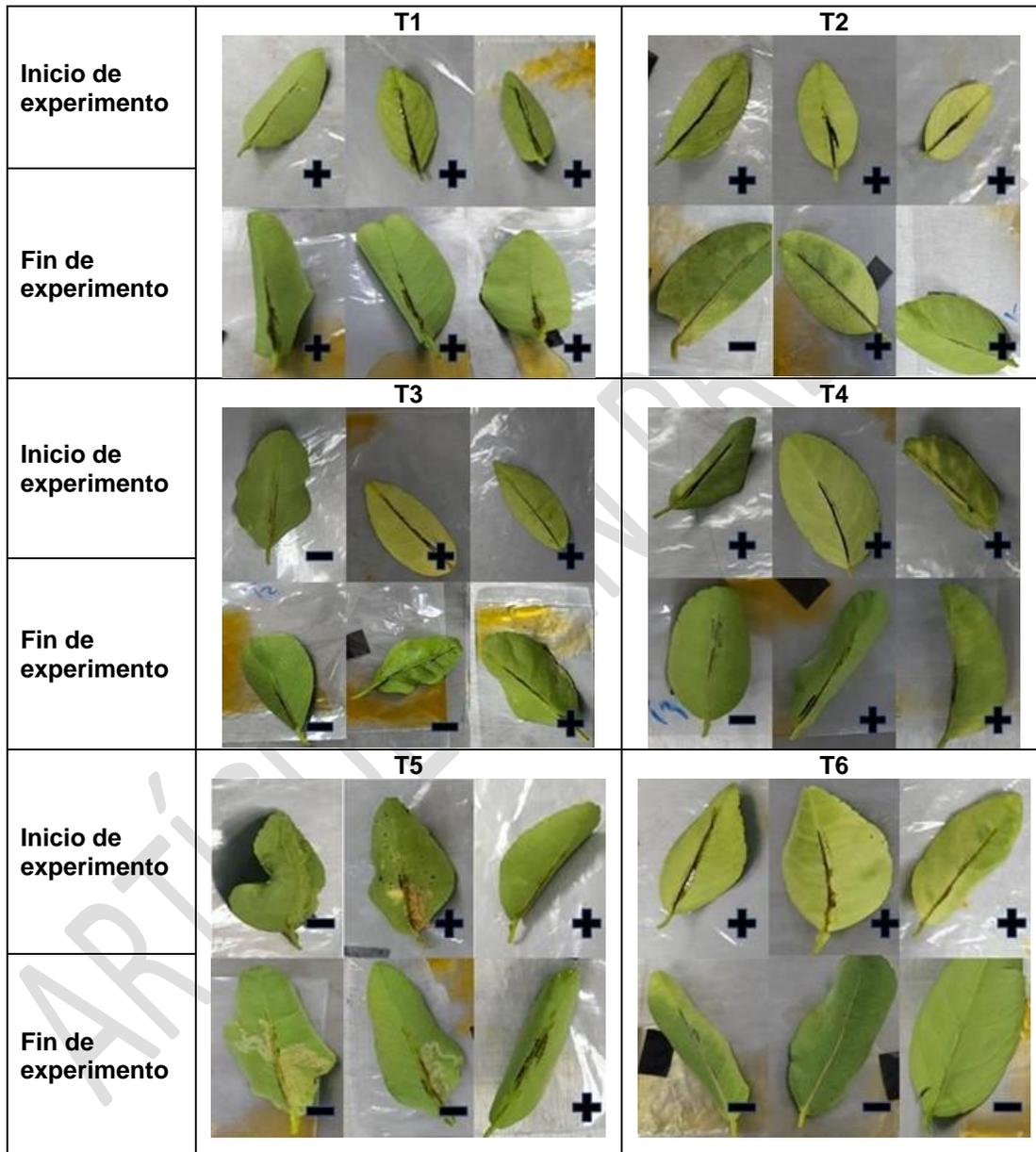


Figura 9. Prueba presuntiva para HLB mediante la prueba con yodo sobre las plantas de limón cultivadas durante 49 días. Coloración marrón en nervadura de la hoja, prueba positiva (+), y ausencia considerada negativa (-). El experimento se realizó por triplicado en cada una de las plantas tratadas.

La prueba presuntiva de yodo, empleada como herramienta preliminar para la detección de HLB, mostró una efectividad del 80 %, lo que la posiciona como un recurso valioso para la

identificación temprana de la enfermedad (Etxeberria et al., 2008). En este estudio, se utilizó esta prueba con éxito para monitorear la respuesta de las plantas tratadas, corroborando la eficacia del tratamiento combinado propuesto. La confirmación definitiva de la ausencia de HLB en las plantas tratadas se obtuvo mediante la prueba de PCR, lo que refuerza la fiabilidad de los resultados obtenidos.

El mecanismo de acción propuesto en este trabajo sugiere que el peróxido de hidrógeno, aplicado en bajas concentraciones y después de una acumulación, afecta la integridad de las membranas bacterianas (Wang et al., 2023), facilitando así la entrada de las NpAg. Estas nanopartículas, gracias a su pequeño tamaño y alta relación superficie-volumen, tienen la capacidad de atravesar las membranas celulares y ejercer su acción bactericida. Las NpAg inhiben la actividad enzimática clave para la supervivencia de las bacterias, lo que lleva a la muerte celular (Rai et al., 2014). Además, el H_2O_2 podría acelerar la oxidación del almidón acumulado en el sistema de xilema de la planta, mejorando el transporte de savia y nutrientes, lo que contribuiría a una recuperación de las plantas afectadas por HLB.

El tratamiento con NpAg y H_2O_2 también demostró tener efectos beneficiosos a nivel fisiológico. Como se observó en este estudio, las plantas tratadas comenzaron a desarrollar nuevos brotes, lo que puede atribuirse al efecto activador del H_2O_2 sobre las funciones fisiológicas de la planta. Aunque el H_2O_2 no cumple todos los requisitos para ser considerado una fitohormona en sentido estricto, su capacidad para inducir cambios en el desarrollo vegetal es bien conocida, lo que sugiere que su aplicación pudo haber contribuido significativamente a la mejora del estado general de las plantas.

La acción bactericida de las NpAg se debe a su capacidad para alterar procesos clave dentro de las células bacterianas. Las nanopartículas interfieren con la permeabilidad de la membrana celular, inhiben la respiración celular, y pueden reaccionar con componentes celulares importantes, como proteínas y ADN, lo que interrumpe la función celular y lleva a la muerte de las bacterias (Pal et al., 2007; Liao et al., 2019). Este mecanismo hace de las NpAg una herramienta muy eficaz en el control de bacterias patógenas como *Candidatus Liberibacter*, el agente causal de HLB.

A través de este estudio, se ha demostrado que el tratamiento combinado de NpAg, H_2O_2 y fertilización química constituye una estrategia efectiva y prometedora para el control de HLB. Las plantas tratadas no solo mostraron una mejora en su desarrollo físico, sino que también evidenciaron una disminución significativa en la carga bacteriana, lo que resalta la importancia de una estrategia integrada que combine control bacteriano y manejo nutricional. Estos hallazgos ofrecen una perspectiva positiva para el futuro manejo de HLB en los cultivos cítricos, proporcionando a los productores una alternativa viable y posiblemente más sostenible frente a la enfermedad.

Este enfoque no solo apunta a la eliminación de la bacteria causante de HLB, sino que también optimiza las condiciones fisiológicas de las plantas afectadas, lo que contribuye a una recuperación integral. Se recomienda, sin embargo, realizar estudios adicionales para

explorar los efectos del tratamiento a largo plazo y analizar en detalle el impacto del tratamiento sobre el sistema radicular y los tejidos conductores de la planta, como el xilema y el floema.

Análisis estadístico

En la Tabla 3 se presentan los valores obtenidos para las variables evaluadas, los cuales revelan diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. En cuanto al número de brotes, se observó que todos los tratamientos difirieron significativamente entre sí, siendo el tratamiento T6 el que mostró el mayor número de brotes. Este hallazgo sugiere que el tratamiento T6 favorece una mayor regeneración vegetativa, lo que es indicativo de una recuperación más eficiente de las plantas afectadas por HLB.

En relación al porcentaje de color verde, el tratamiento T6 destacó nuevamente, mostrando diferencias significativas respecto a los demás tratamientos. Este resultado indica que T6 no solo estimula el crecimiento de nuevos brotes, sino que también mejora la salud general de la planta, al promover una mayor intensidad de color verde en las hojas, lo que refleja una mejora en la actividad fotosintética y en la integridad de las células vegetales.

Respecto al tamaño de la planta, los tratamientos T2, T3, T4 y T6 no presentaron diferencias significativas entre sí, sin embargo, el tratamiento T5 presentó el valor más alto en esta variable. Esto sugiere que, aunque T6 es altamente efectivo en cuanto al número de brotes y contenido de clorofila, el tratamiento T5 tiene un impacto notable en el crecimiento general de las plantas, posiblemente relacionado con un mejor aprovechamiento de los nutrientes y un aumento en la biomasa de las plantas tratadas.

En cuanto al contenido de clorofila, los tratamientos T5 y T6 mostraron los valores más altos, sin diferencias significativas entre ellos, pero con valores significativamente superiores en comparación con los demás tratamientos. Esto indica que tanto T5 como T6 favorecen una mejor fotosíntesis y una mayor acumulación de clorofila en las hojas, lo que es indicativo de una mejora en la salud general de las plantas.

Los resultados sugieren que los tratamientos que combinan nanopartículas de plata, peróxido de hidrógeno y fertilización química, son significativamente más efectivos en la recuperación y mejora de las plantas de limón persa afectadas por HLB. Estos tratamientos no solo contribuyen a una mejor regeneración foliar, sino que también optimizan el crecimiento y la salud general de las plantas, lo que representa una alternativa prometedora para el manejo de esta enfermedad en los cultivos cítricos.

Los tratamientos T5 y T6, que presentaron un mayor número de brotes nuevos (11.00 ± 1.00 y 13.33 ± 0.58 , respectivamente), sugieren que las NpAg y el H_2O_2 podrían haber reducido la carga bacteriana mediante la inhibición de la actividad enzimática de la bacteria, mejorando simultáneamente el transporte de nutrientes en las plantas (Chen & Schluesener, 2008; Nazir et al., 2020). La fertilización, especialmente en los tratamientos

T5 y T6, proporcionó los nutrientes esenciales que permitieron a las plantas superar el estrés causado por la infección, promoviendo la regeneración del tejido dañado y la producción de nuevos brotes.

Tabla 3. Análisis estadístico de las variables analizadas

T	NB	CV	Tamaño	Clorofila
		%	Cm	µg/ml
T1	2.50 ± 0.71 ^a	36.00 ± 1.41 ^a	72.50 ± 10.61 ^a	12.08 ± 0.11 ^a
T2	4.33 ± 0.58 ^a	51.33 ± 3.21 ^b	78.33 ± 16.07 ^{ab}	16.11 ± 0.28 ^b
T3	4.33 ± 0.58 ^a	50.33 ± 3.06 ^b	91.67 ± 2.89 ^{ab}	16.27 ± 0.38 ^b
T4	7.67 ± 0.58 ^b	52.50 ± 2.12 ^{bc}	110.00 ± 14.14 ^{ab}	18.15 ± 0.21 ^c
T5	11.00 ± 1.00 ^c	64.00 ± 1.41 ^{cd}	125.00 ± 7.07 ^c	22.25 ± 0.35 ^d
T6	13.33 ± 0.58 ^d	63.00 ± 5.57 ^d	98.33 ± 2.89 ^{abc}	23.25 ± 0.35 ^d

T = Tratamiento, NB = Número de brotes, CV = Porcentaje de color verde

El amarillamiento de las hojas, un síntoma característico de HLB, se debe a una alteración en el metabolismo de la clorofila y la movilidad de los nutrientes dentro de la planta. Los tratamientos T5 y T6, que mostraron los porcentajes de color verde más altos (64.00 ± 1.41 y 63.00 ± 5.57), indican que el H₂O₂, además de sus propiedades bactericidas, actúa como una molécula señalizadora que mejora la resistencia de las plantas frente a los patógenos, fortaleciendo las paredes celulares y promoviendo la reparación de los tejidos dañados (Gill & Tuteja, 2010). La reducción de la obstrucción en los vasos conductores permite una mayor circulación de agua y nutrientes, lo que contribuye a la recuperación de la pigmentación foliar y al restablecimiento de la actividad fotosintética en las plantas.

En cuanto al crecimiento general de las plantas, el HLB reduce la capacidad de las plantas para transportar carbohidratos y otros nutrientes esenciales, lo que impacta negativamente su desarrollo. Los tratamientos T5 y T6, que presentaron los tamaños de planta más altos (125.00 ± 7.07 y 98.33 ± 2.89 cm), reflejan que las NpAg mejoran la disponibilidad de nutrientes al sistema vascular, reduciendo el daño bacteriano en los vasos conductores y facilitando el transporte eficiente de agua y nutrientes (UI Islam et al., 2023). La combinación con fertilización, especialmente la química en el tratamiento T6, proporciona los macro y

m micronutrientes necesarios para la recuperación de la planta, favoreciendo su crecimiento y fortalecimiento general.

El HLB también interfiere con la producción de clorofila, un componente esencial para el proceso de fotosíntesis. Los tratamientos T5 y T6 mostraron un contenido de clorofila significativamente superior ($23.25 \pm 0.35 \mu\text{g/ml}$ y $22.25 \pm 0.35 \mu\text{g/ml}$, respectivamente), lo que indica una mejora en la función fotosintética de las plantas tratadas. Tanto el H_2O_2 como las NpAg favorecen la regeneración del tejido fotosintéticamente activo, contribuyendo a la reducción de los síntomas visibles de la enfermedad (Gill & Tuteja, 2010).

El tratamiento T6, que combina nanopartículas de plata, H_2O_2 y fertilización química, resulta especialmente efectivo contra los efectos del HLB debido a su capacidad para abordar múltiples aspectos del proceso patológico. En primer lugar, las NpAg ejercen una acción directa sobre la carga bacteriana, inhibiendo la proliferación de *Candidatus Liberibacter* dentro de los vasos conductores. Por otro lado, el H_2O_2 actúa como una señal química que desencadena respuestas de defensa en la planta, estimulando la producción de compuestos protectores y mejorando el transporte vascular. Esta sinergia entre los componentes del tratamiento no solo reduce la carga bacteriana, sino que también promueve la restauración de la función vascular y la recuperación de la planta a nivel estructural y fisiológico.

Conclusiones

El peróxido de hidrógeno tuvo un impacto positivo en las plantas tratadas, evidenciando una mejora significativa en la coloración foliar, una atenuación del engrosamiento de la nervadura central y la aparición de brotes con una coloración más saludable.

La combinación de NpAg y H_2O_2 mostró un efecto sinérgico en el control de HLB, acelerando la mejora en la coloración de las hojas, la aparición de nuevos brotes y la reducción del engrosamiento de la nervadura central en un período más corto.

Los tratamientos que integran NpAg y H_2O_2 , complementados con fertilización orgánica o química, demostraron ser más efectivos en el control del HLB, favoreciendo una respuesta rápida en la mejora de las plantas, con resultados notables en la aparición temprana de brotes, la mejora en la coloración de las hojas y la reducción de los síntomas de la enfermedad.

La combinación de tratamientos bactericidas con un manejo adecuado de la nutrición, tanto orgánica como química, mejora sustancialmente la salud general de las plantas de limón, destacándose como una estrategia prometedora para el manejo de HLB en los cultivos cítricos.

Contribución de los autores

“Conceptualización del trabajo, autor 1 y autor 4.; desarrollo de la metodología, autor 1 3.; validación experimental, autor 2 y autor 3; análisis de resultados, autor 1 y autor 4.; Manejo de datos, autor 1; escritura y preparación del manuscrito, autor 1, autor 2, autor 3 y autor 4.; redacción, revisión y edición, autor 1, autor 2, autor 3 y autor 4.; “Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.” Para nombrar a los participantes, deberán usarse siglas de su nombre. La autoría debe limitarse a aquellos que hayan contribuido sustancialmente al trabajo informado.

Financiamiento

Esta investigación no recibió financiamiento externo

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

- Ahmad, P. (2014). Oxidative Damage to Plants – Antioxidant Networks and Signaling. Pp. 65-88. Academic Press, Elsevier Inc., New York.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Bassanezi, R. B., Belasque, J., & Montesino, L. H. (2013). Frequency of symptomatic trees removal in small citrus blocks on citrus huanglongbing epidemics. *Crop Protection*, 52, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.05.012>
- Boina, D. R., & Bloomquist, J. R. (2015). Chemical control of the Asian citrus psyllid and of huanglongbing disease in citrus. *Pest Management Science*, 71(6), 808–823. <https://doi.org/10.1002/ps.3957>
- Chen, X., & Schluesener, H. J. (2008). Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*, 176(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.004>
- Dietz, K.-J., Mittler, R., & Noctor, G. (2016). Recent Progress in Understanding the Role of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Signaling. *Plant Physiology*, 171(3), 1535–1539. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00938>
- Etxeberria, E., Gonzalez, P., Dawson, W. O., & Spann, T. (2008). Iodine-Based Starch Test to Assist in Selecting Leaves for HLB Testing. *EDIS*, 2008(2). <https://doi.org/10.32473/edis-hs375-2007>
- Frank, A. J., Cathcart, N., Maly, K. E., & Kitaev, V. (2010). Synthesis of silver nanoprisms with variable size and investigation of their optical properties: a first-year undergraduate experiment exploring plasmonic nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, 87(10), 1098–1101. <https://doi.org/10.1021/ed100166g>
- Ghosh, D., Kokane, S., Savita, B. K., Kumar, P., Sharma, A. K., Ozcan, A., Kokane, A., & Santra, S. (2022). Huanglongbing Pandemic: Current Challenges and Emerging Management Strategies. *Plants*, 12(1), 160. <https://doi.org/10.3390/plants12010160>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

- González, M., Rodríguez, G., M., Hernández, M. I.; Rodríguez, C., Rieumont, J., Cuesta, Er., Sardinas, C., & Morales, A. (2005). Obtención de un fertilizante de liberación lenta y controlada enriquecido con diferentes plantas marinas. *Revista Cubana de Química*, 8 (3), 25-31.
- Habibullah, C., Saravaiya, S. N., Tandel, Y. N., Kumarm S., Paterland, N. B., & Golakiya, P. D. (2019). Effect of Foliar Application of Micronutrients on Growth and Yield of Tomato under Protected. *Trends in Biosciences*, 10(14), 2491-2495
- Hernández-Landa, L., López-Collado, J., Nava-Tablada, M. E., García-García, C. G., & Osorio-Acosta, F. (2017). Percepción de la problemática del Huanglongbing por agentes relevantes en zonas urbanas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(4). <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i4.23>.
- Hu, J., Jiang, J., & Wang, N. (2018). Control of citrus Huanglongbing via trunk injection of plant defense activators and antibiotics. *Phytopathology*, 108(2), 186-195. <https://doi.org/10.1094/PHTO-05-17-0175-R>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2010). Censo de información geográfica municipal 2010. Gutiérrez Zamora Veracruz de Ignacio de la Llave. In https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/30/30069.pdf. Consulted 20 enero 2025
- Khaydarov, R. R., Khaydarov, R. R., & Estrin, Y. (2009). Silver particles. In: Linkov, I. and Steevens, J., Eds., *Nanomaterials: Risks and Benefits*. Springer Science, 287-297.
- Ladaniya, M. (2023). Preharvest factors. In *Citrus Fruit* (pp. 113–144). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99306-7.00010-4>
- Liao, C., Li, Y., & Tjong, S. C. (2019). Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 449. <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>
- Liheng, H., Zhiqiang, G., & Runzhi, L. (2009). Pretreatment of seed with H₂O₂ enhances drought tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *African Journal of Biotechnology*, 8(22), 6151–6157. <https://doi.org/10.5897/AJB09.490>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G. A. D., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., & Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave?. *Trends Plant Science*, 16(6), 300-309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>
- Nazir, F., Fariduddin, Q., & Khan, T. A. (2020). Hydrogen peroxide as a signalling molecule in plants and its crosstalk with other plant growth regulators under heavy metal stress. *Chemosphere*, 252, 126486. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126486>
- Noorzadeh, S., Golmohammadi, M., Bagheri, A., & Bertaccini, A. (2022). Citrus industry: Phytoplasma-associated diseases and related challenges for Asia, America and Africa. *Crop Protection*, 151, 105822. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105822>
- Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1712-1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>
- Pérez-González, O., Gomez-Flores, R., & Tamez-Guerra, P. (2022). Insight into Biological Control Potential of *Hirsutella citriformis* against Asian Citrus Psyllid as a Vector of Citrus Huanglongbing Disease in America. *Journal of Fungi*, 8(6), 573. <https://doi.org/10.3390/jof8060573>
- Rai, M., Kon, K., Ingle, A., Duran, N., Galdiero, S. & Galdiero, M. (2014). Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects. *Applied Microbiology Biotechnology*, 98(5), 1951-1961. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5473-x>
- Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. Á., Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia, V. M., López-Arroyo, J. I., & Flores-Virgen, R. (2013). Huanglongbing (HLB) DISEASE IN mexican lime TREES [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] and its dispersion in Colima state, MEXICO. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, XIX(1), 15–31. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.01.005>



- Takushi, T., Toyozato, T., Kawano, S., Taba, S., Taba, K., Ooshiro, A., Numazawa, M., & Tokeshi, M. (2007). Scratch method for simple, rapid diagnosis of *citrus huanglongbing* using iodine to detect high accumulation of starch in the citrus leaves. *Japanese Journal of Phytopathology*, 73(1), 3–8. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.73.3>
- Thakuria, D., Chaliha, C., Dutta, P., Sinha, S., Uzir, P., Singh, S. B., Hazarika, S., Sahoo, L., Kharbikar, L. L., & Singh, D. (2023). *Citrus Huanglongbing* (HLB): Diagnostic and management options. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 125, 102016. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102016>
- Uddling, J., Gelang-Alfredsson, J., Piikki, K., & Pleijel, H. (2007). Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 readings. *Photosynthesis Research*, 91(1), 37-46. <https://doi.org/10.1007/s1120-006-9077-5>.
- Ul Islam, S.N., Asgher, M., & Khan, N.A. (2023). Hydrogen Peroxide and Its Role in Abiotic Stress Tolerance in Plants. In: Fatma, M., Sehar, Z., Khan, N.A. (eds) Gasotransmitters Signaling in Plant Abiotic Stress. Signaling and Communication in Plants. *Springer, Cham*. https://doi.org/10.1007/978-3-031-30858-1_9
- Wang, X., Xu, H., & Pei, H. (2023). Comparing the Effects and Mechanisms of Action of Permanganate, Chlorine, and Hydrogen Peroxide on the Membrane Integrity of *Pseudanabaena* sp. Cells. *ACS ES&T Water*, 3(2), 588–597. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.2c00573>
- Zhang, M., Guo, Y., Powell, C. A., Doud, M. S., Yang, C., & Duan, Y. (2014). Effective Antibiotics against '*Candidatus liberibacter asiaticus*' in HLB-Affected Citrus Plants Identified via the Graft-Based Evaluation. *PLoS ONE*, 9(11), e111032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111032>
- Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>