

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la vida
con orientación en Microbiología**

**Biosíntesis de nanopartículas de óxido de cobre a partir de
Trichoderma spp. y su efecto contra hongos patógenos de vid**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Jose Uriel Tolama Sosa

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Jose Uriel Tolama Sosa

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Codirectora de tesis

Dra. Rufina Hernández Martínez
Codirectora de tesis

Dr. Rodrigo Méndez Alonzo

Dr. Miguel Ángel Alonso Arévalo



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez-Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denisse Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Jose Uriel Tolama Sosa** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la vida [con orientación en Microbiología Celular y Molecular](#)

Biosíntesis de nanopartículas de óxido de cobre a partir de *Trichoderma* spp. y su efecto contra hongos patógenos de vid

Resumen aprobado por:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Codirectora de tesis

Dra. Rufina Hernández Martínez
Codirectora de tesis

La muerte regresiva por *Botryosphaeria* en vid es causada por hongos de la familia *Botryosphaeriaceae*. Estos patógenos pueden ocasionar pérdidas económicas importantes, por lo que es necesario buscar alternativas para controlar de manera eficiente estos patógenos. En las últimas décadas se ha acrecentado el uso de agentes de biocontrol que, gracias a sus mecanismos de acción, son capaces de controlar a algunas especies patógenas en los cultivos de la vid. Un ejemplo son las especies de *Trichoderma* las cuales tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios tóxicos y enzimas degradadoras de la pared celular de algunos hongos. Con el uso de la nanotecnología es posible sintetizar nanopartículas, las cuales pueden inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, sin embargo, los métodos de síntesis pueden llegar a ser tóxicos y de alto costo; es por ello que se propone el uso de especies de *Trichoderma* para realizar biosíntesis de nanopartículas, las cuales al ser acopladas a los metabolitos secundarios y enzimas que posee *Trichoderma*, podrían tener una inhibición mejorada en el control de los hongos patógenos. Este trabajo tuvo como objetivo, sintetizar nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) por medio de las cepas de *Trichoderma* y evaluar su inhibición contra patógenos de la vid. Se evaluaron tres especies de *Trichoderma asperellum*, EF09, T11 y T15, las cuales fueron cultivadas en distintos medios para elegir el que promoviera mayor producción de metabolitos secundarios. A partir de esto, se eligieron las cepas T15 (PT15) y EF09 en medio PDB (PQ09). Por medio de ensayos por envenenamiento, se evaluó la inhibición *in vitro* de las CuONPs de la T15 y EF09. La caracterización de las nanopartículas indicó una forma cuasi-esférica, un potencial Z de -28mV y con absorción de longitud de onda en 320 nm, correspondiente al CuO de las nanopartículas. Con base a los resultados obtenidos, la mayor inhibición fue observada con las CuONPs EF09 contra el hongo patógeno *Lasiodiplodia brasiliensis* MXBCL28.

Palabras clave: *Botryosphaeria*, *Trichoderma*, Nanopartículas, Inhibición, Patógenos de la vid.

Abstract of the thesis presented by **Jose Uriel Tolama Sosa** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in **Molecular and Cellular Microbiology**

Biosynthesis of copper oxide nanoparticles from *Trichoderma* spp. and its effect against grapevine fungi pathogens.

Abstract approved by:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Thesis Codirector

Dra. Rufina Hernández Martínez
Thesis Codirector

Botryosphaeria dieback in grapevines is caused by fungi of the Botryosphaeriaceae family. These pathogens can cause significant economic losses, so it is necessary to search for efficient alternatives to control these pathogens. In recent decades, the use of biocontrol agents has increased, due to their mechanisms of action, which allow to control some pathogenic species in grapevines. An example is *Trichoderma* which can produce toxic secondary metabolites and cell wall degrading enzymes affecting some pathogenic fungi. By using nanotechnology, it is possible to synthesize nanoparticles, which can inhibit some microorganisms; however, the methods of synthesis of these particles can become toxic and expensive. To overcome this disadvantage, *Trichoderma* species are proposed to be used as carriers of the biosynthesis of nanoparticles, thus coupling the intrinsic advantageous properties of nanoparticles with the secondary metabolites and enzymes from *Trichoderma* to enhance the inhibition and control of pathogenic fungi. The objective of this work was to synthesize copper oxide nanoparticles (CuONPs) by *Trichoderma* strains and to evaluate their inhibition against grapevine pathogens. Three species of *Trichoderma asperellum*, EF09, T11 and T15, were cultivated in different media, aiming to choose the one that promoted the highest production of secondary metabolites. From this survey, the strains T15 (PT15) and EF09 in PDB medium (PQ09) were chosen. Throughout poisoning assays, the *in vitro* inhibition of the CuONPs of T15 and EF09 was evaluated. The characterization of the nanoparticles indicated a spherical shape, a Z potential of -28mV and a wavelength absorption of 320nm, corresponding to the CuO of the nanoparticles. Based on the results obtained, the highest inhibition was observed with CuONP EF09 against the pathogenic fungus *Lasiodiplodia brasiliensis* MXBCL28.

Keywords: Botryosphaeria, *Trichoderma*, Nanoparticles, Inhibition, Grapevine pathogens.

Dedicatoria

A mis padres por impulsarme siempre a seguir adelante y superarme, por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia. Gracias por todo el amor que me dan, por creer en mí y ser parte de todas las decisiones que he tomado hasta hoy.

A mi familia, mi hermana Cinthya y Linda, mi sobrino Ramsés por el apoyo que me dan siempre y por ser parte de mi motivación todos los días de mi vida, su amor y apoyo incondicional fueron indispensables para alcanzar mi meta.

A mi novia, Karla, por todo tu amor y por estar a mi lado desde el inicio, gracias a ti porque fuiste mi apoyo incondicional y me diste fuerza para superar cada obstáculo y por mantenerme enfocado en mis objetivos, gracias por escucharme y apoyarme en este camino.

A mis queridos amigos DiCaprios team, por escucharme, darme ánimo y por creer en mí. Estoy agradecido con la vida por tenerlos a mi lado. Espero poder retribuirles lo mucho que me han dado, y poder seguir contando con su amistad toda la vida. Los amo y valoro mucho.

"Aunque la ciencia nos haya llevado lejos,
todavía necesitamos la ayuda de la imaginación."

– Brand, Interestelar.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada Baja California, por la oportunidad otorgada de continuar mi formación profesional. Al Programa de Maestría en Ciencias de la Vida (No. De matrícula 20294700), al CONACyT por la beca (No. Becario 1062050) que se me otorgó para realizar mis estudios de maestría.

A la Dra. Ernestina por aceptarme en su laboratorio desde 2014 en mis prácticas profesionales de la universidad y permitirme conocer el ambiente de trabajo en un laboratorio y el mundo de la ciencia. También por permitir que siguiera creciendo profesionalmente por toda la paciencia que me tuvo a pesar de las dificultades, por su confianza, consejos y ayuda en todo momento. Muchas gracias por todo.

A la Dra. Rufina de igual manera por aceptarme en su laboratorio, por la paciencia para mostrarme cómo realizar cada paso del proyecto, por la confianza y ayuda que me brindó en todo momento y por ayudarme a resolver cada duda que tuve en el proyecto. Le estaré siempre agradecido por esta oportunidad.

Al Dr. Rodrigo por su ayuda en la elaboración de mi tesis, por su paciencia y dedicación para mostrarme cómo realizar cada paso del análisis estadístico que fue fundamental para obtener resultados. También al Dr. Miguel Ángel por sus comentarios y disposición durante la maestría, gracias por la disposición de ambos.

A Carmen y Edelweiss, que fueron grandes compañeras de trabajo y grandes amigas, que siempre estuvieron para ayudarme a resolver las dudas que surgían, por enseñarme a hacer mejor el trabajo y por el tiempo que se tomaron para estar ahí para mí.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Cultivo de vid.....	2
1.1.2 Enfermedades de la vid.....	3
1.1.3 <i>Trichoderma</i> spp. como agentes de biocontrol	4
1.1.4 Nanopartículas	5
1.1.5 Propiedades antifúngicas de las nanopartículas.....	5
1.1.6 Obtención de nanopartículas por medio de especies de <i>Trichoderma</i>	6
1.2 Justificación	7
1.3 Hipótesis.....	8
1.4 Objetivos	8
1.4.1 Objetivo general.....	8
1.4.2 Objetivos específicos.....	8
Capítulo 2. Metodología.....	9
2.1 Crecimiento de especies de <i>Trichoderma</i> y <i>Lasiodiplodia</i>	9
2.2 Preparación de la biomasa fúngica para la elección de medio y biosíntesis de CuONPs	11

2.3	Elección del medio de cultivo para producción de metabolitos secundarios.....	11
2.4	Biosíntesis de CuONPs a 5 mM	12
2.5	Actividad antifúngica de las CuONPs sintetizadas en ensayos <i>in vitro</i>	12
2.6	Preparación de cultivo de <i>Trichoderma</i>	13
2.7	Biosíntesis de CuONPs a 10 mM	13
2.8	Actividad antifúngica de las CuONPs a 10 mM	14
2.9	Preparación de muestras para caracterización y estabilidad de las CuONPs	14
2.10	Actividad antifúngica de las CuONPs en planta	15
Capítulo 3. Resultados		16
3.1	Preparación de la biomasa fúngica	16
3.2	Selección del medio de cultivo para producción de metabolitos secundarios.....	18
3.3	Biosíntesis de CuONPs.....	20
3.4	Actividad antifúngica de las CuONPs sintetizadas en ensayos <i>in vitro</i>	23
3.5	Biosíntesis de CuONPs.....	25
3.6	Actividad antifúngica de las CuO NPs a 10mM	26
3.7	Caracterización y estabilidad de las CuONPs	29
3.8	Actividad antifúngica de las CuONPs en plantas de vid cv. Cabernet Sauvignon	32
Capítulo 4. Discusión.....		34
Capítulo 5. Conclusiones		38
Literatura citada		39

Lista de figuras

Figura	Página
1	Morfología en placa de cepas de <i>T. asperellum</i> EF09, <i>T. asperellum</i> T11 y <i>T. asperellum</i> T15.10
2	Morfología en placa de <i>L. gilaniensis</i> CHCS3-310
3	Biomasa de <i>T. asperellum</i> EF09 en medios PDB y MEB con y sin quitina16
4	Biomasa de <i>T. asperellum</i> T11 en medios PDB y MEB con y sin quitina17
5	Biomasa de <i>T. asperellum</i> T15 en medios PDB y MEB con y sin quitina17
6	Efecto de los sobrenadantes de las distintas cepas de <i>T. asperellum</i> sobre el crecimiento de <i>L. gilaniensis</i> CHCS3-3 a las 24 horas de Incubación.....18
7	Efecto de los sobrenadantes de las distintas cepas de <i>T. asperellum</i> sobre el crecimiento de <i>L. gilaniensis</i> CHCS3-3 a las 34 horas de incubación.....19
8	Crecimiento en el tiempo de <i>L. gilaniensis</i> CHCS3-3 en los distintos sobrenadantes de las cepas de <i>T. asperellum</i>21
9	Inhibición del crecimiento de <i>L. gilaniensis</i> CHCS3-3 por nanopartículas de óxido de cobre a las 18 horas.....23
10	Inhibición del crecimiento de <i>L. gilaniensis</i> CHCS3-3 por nanopartículas de óxido de cobre a las 30 horas.....24
11	Crecimiento por tiempo de <i>L. gilaniensis</i> CHCS3-3 en ensayo de inhibición con nanopartículas ..25
12	Viraje de las nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas con los sobrenadantes S1 y S2.....25
13	Inhibición del crecimiento de <i>L. gilaniensis</i> por nanopartículas de cobre medido a las 24 horas en medio PDA.....26
14	Inhibición del crecimiento de <i>L. gilaniensis</i> por CuONPs a las 48 horas.....27
15	Inhibición del crecimiento de <i>L. gilaniensis</i> por CuONPs a las 72 horas28
16	Inhibición del crecimiento de <i>L. gilaniensis</i> por CuONPs a las 96 horas.28
17	Distribución del potencial zeta de las CuONPs EF09.....30
18	Espectro de UV-Vis de CuO NPs EF0930
19	Imagen obtenida a través de microscopía electrónica de transmisión.31
20	Distribución del tamaño de las CuONPs EF09.....31

21 Lesiones generadas después de 2 meses de tratamiento en plantas de vid. p: indica tratamientos inoculados con *Lasiodiplodia brasiliensis* MXBCL2833

22 Longitud de lesión causada por *Lasiodiplodia brasiliensis* MXBCL28 en plantas de vid 2 meses después de la inoculación bajo condiciones de invernadero33

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Características generales de <i>Trichoderma</i> spp. que lo hacen un buen organismo de biocontrol contra hongos fitopatógenos	9
2 Área promedio de crecimiento en el tiempo de <i>Lasiodiplodia</i> CHCS3-3 en los distintos S1 de las cepas de <i>Trichoderma asperellum</i>	20
3 Sobrenadantes seleccionados para realizar la síntesis de las CuONPs	22
4 Área promedio de crecimiento de <i>Lasiodiplodia gilaniensis</i> CHCS3-3 medidas por ImageJ en el ensayo de inhibición con nanopartículas	24
5 Crecimiento del hongo <i>Lasiodiplodia gilaniensis</i> CHCS3-3 con los diferentes tratamientos, monitoreados cada 24 horas	29

Lista de abreviaciones

PDB	Caldo de papa dextrosa
MEB	Caldo de extracto de malta
PDB+Q	Caldo de papa dextrosa con quitina
MEB+Q	Caldo de extracto de malta con quitina
P09	Sobrenadante de <i>T. asperellum</i> EF09 en medio PDB
PQ09	Sobrenadante de <i>T. asperellum</i> EF09 en medio PDB suplementado con quitina al 0.03%
PT11	Sobrenadante de <i>T. asperellum</i> T11 en medio PDB
PQT11	Sobrenadante de <i>T. asperellum</i> T11 en medio PDB suplementado con quitina al 0.03%
PT15	Sobrenadante de <i>T. asperellum</i> T15 en medio PDB
PQT15	Sobrenadante de <i>T. asperellum</i> T15 en medio PDB suplementado con quitina al 0.03%
M09	Sobrenadante de <i>T. asperellum</i> EF09 en medio MEB
MQ09	Sobrenadante de <i>T. asperellum</i> EF09 en medio MEB suplementado con quitina al 0.03%
MT11	Sobrenadante de <i>T. asperellum</i> T11 en medio PDB
MQT11	Sobrenadante de <i>T. asperellum</i> T11 en medio PDB suplementado con quitina al 0.03%
MT15	Sobrenadante de <i>T. asperellum</i> T15 en medio PDB
MQT15	Sobrenadante de <i>T. asperellum</i> T15 en medio PDB suplementado con quitina al 0.03%
TA	Temperatura ambiente
S1	Sobrenadante filtrado
S2	Sobrenadante libre de restos de nutrientes
CuONPs	Nanopartículas de óxido de cobre
CuSO₄·5H₂O	Sulfato de cobre pentahidratado
NaOH	Hidróxido de sodio
CuO	Óxido de cobre
NP	Nanopartícula
S1 CuONPs	Nanopartículas de óxido de cobre a partir de sobrenadante filtrado

S2 CuONPs	Nanopartículas de óxido de cobre a partir de sobrenadante libre de restos de nutrientes
DLS	Dispersión de luz dinámica
UV-Vis	Espectroscopía ultravioleta-visible
CuONPs PQ09	Nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas por la <i>T. asperellum</i> EF09 previamente cultivada en medio PDB suplementado con quitina al 0.03%
CuONPs PT11	Nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas por la <i>T. asperellum</i> T11 previamente cultivada en medio PDB
CuONPs PT15	Nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas por la <i>T. asperellum</i> T15 previamente cultivada en medio PDB
CuONPs PQT15	Nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas por la <i>T. asperellum</i> T15 previamente cultivada en medio PDB suplementado con quitina al 0.03%

Capítulo 1. Introducción

En México, el cultivo de uva es de gran importancia, debido al volumen de producción de 453,519 toneladas según datos del Panorama Agroalimentario 2021, lo cual se traduce a una gran derrama económica en el país. Baja California y Sonora son de los estados de la república con mayor producción de vid. Baja California produce cerca del 90% de los vinos del país, y Sonora por su parte, produce alrededor del 95% de la uva de mesa mexicana (González-Andrade, 2015). Las enfermedades en el cultivo de vid ocasionan pérdidas económicas importantes, llegando a significar hasta el 20% o más del costo de producción (Serrano et al., 2019), por lo que es imprescindible buscar alternativas efectivas para su control.

Algunas de las enfermedades más problemáticas que afectan a la vid son las causadas por los hongos de la madera (Florence et al., 2016). Dentro de las enfermedades de la madera podemos encontrar el complejo de la Esca, la muerte regresiva por *Botryosphaeria* y la muerte regresiva por *Eutypa*. Todas estas enfermedades son ocasionadas por distintos patógenos, sin embargo, la superfamilia de la *Botryosphaeriaceae* incluye algunos de los patógenos más relevantes, como lo son el género de *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Lasioidiplodia*, *Dothiorella*, entre otros (Úrbez-Torres 2014; Carlucci et al., 2015).

Las técnicas de control actuales para enfermedades de la madera se basan en estrategias preventivas a través de prácticas culturales como: utilizar material de propagación libre de enfermedades, esterilizar las herramientas de poda, aplicar pintura protectora en los cortes de poda y retirar las plantas infectadas de los viñedos para evitar daños (Mondello et al., 2018). También existen otras alternativas para el control de enfermedades, como lo es el uso de químicos y agentes de biocontrol. El uso de químicos resulta perjudicial a largo plazo, debido a los efectos en el medio ambiente que pueden generar contaminación del suelo, bioacumulación, lixiviación y contaminación de mantos acuíferos, entre otras cosas (Tudi et al., 2021).

En el uso de agentes de biocontrol, las especies de *Trichoderma* han tenido un rol protagónico debido a su actividad antagónica y micoparasitismo contra algunos hongos patógenos, por los metabolitos secundarios que produce, además de enzimas degradadoras de pared celular (Florence et al., 2016).

La capacidad de especies de *Trichoderma* para producir metabolitos secundarios y enzimas degradadoras de pared celular ha resultado en su utilización para la biosíntesis de nanopartículas y así aumentar el efecto

inhibitorio de las nanopartículas contra microorganismos patógenos (Abdel-Kareem et al., 2018). La síntesis de nanopartículas puede realizarse por métodos físicos, químicos o biológicos. En este último método, se usa el material biológico que es el encargado de la oxidación/reducción de los metales para formar las nanopartículas (Prabhu y Poulouse, 2012). El método biológico posee algunas ventajas con respecto a los métodos físicos y químicos, por ser más amigable con el medio ambiente y no usar químicos durante el proceso (Salem y Founda, 2021). Las nanopartículas de plata han sido las más estudiadas por sus propiedades antimicrobianas, sin embargo, el uso del cobre como metal precursor en la síntesis de nanopartícula se caracteriza por ser más ecológico, seguro y rentable, que, aunado a su actividad antimicrobiana, lo hace un buen candidato para la síntesis de nanopartículas (Waris et al., 2020). Las aplicaciones de las nanopartículas de óxido de cobre van desde el uso biomédico, como antibiótico o entrega de fármacos, hasta su uso en industrias textiles o de remediación en medio ambiente.

En este trabajo, mediante el uso de la nanotecnología, se biosintetizaron nanopartículas de óxido de cobre utilizando cepas de *Trichoderma asperellum*. Las nanopartículas se caracterizaron fisicoquímicamente y se evaluó su efecto en ensayos *in vitro* e *in planta* contra hongos fitopatógenos del género *Lasiodiplodia*, agentes causales de muerte regresiva en la vid.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Cultivo de vid

La planta de vid (*Vitis vinifera*) se caracteriza por ser un arbusto trepador con zarcillos que le permiten sujetarse a la superficie de crecimiento, un tallo con crecimiento simpodial, nudos hinchados y hojas alternas y simples con estípulas (Bibiloni et al., 2002). La vid crece de forma controlada con sus brazos extendidos hacia los costados de manera que se puedan anclar a los soportes.

Baja California es uno de los estados con mayor producción agrícola en el país. Sus productos son de calidad de exportación. Las pérdidas y el combate de enfermedades, llega a representar el 20% o más del costo de producción (Serrano et al., 2019), por lo que es de suma importancia controlar a los microorganismos fitopatógenos que las ocasionan. Según datos del Panorama Agroalimentario 2021, el estado de Baja California destaca entre los mayores productores de vid, siendo el cuarto estado con mayor

producción de uva fruta y segundo en uva industrial. La uva bajacaliforniana se destina principalmente a la producción de vinos.

1.1.2 Enfermedades de la vid

Existen diferentes patógenos que pueden provocar distintas enfermedades a los cultivos de la vid, desde las bacterias, como *Xylella fastidiosa* que causa la enfermedad de Pierce (Szegedi y Civerolo, 2011), y *Allorhizobium vitis* y *Agrobacterium tumefaciens* causantes de la enfermedad de la agalla de la corona (Szegedi y Civerolo, 2011), que ocasionan la aparición de tumores en las partes leñosas de las vides infectadas y pueden cubrir toda la superficie del tronco o solo aparecer como heridas localizadas. Los virus, como los Closterovirus, relacionados con el enrollamiento de las hojas de vid que, en casos graves ocasionan que toda la superficie de la hoja adquiera un color púrpura intenso. Las vides afectadas carecen de vigor y tienen una vegetación retrasada y esto ocasiona que la maduración de la baya sea irregular. Los Nepovirus son causantes de la hoja en abanico de la vid, que causan clorosis de las hojas y disminuyen la calidad del fruto (Martelli, 2001). Las enfermedades causadas por hongos son las que provocan mayores pérdidas económicas. Los hongos del género *Phaeacremonium* spp. y *Phaeomoniella chlamidospora* son causantes de la enfermedad de Petri (Agustí et al., 2013) que provoca crecimiento débil y lento, una menor masa foliar, necrosis y defoliación temprana. También aparecen lesiones necróticas en las raíces. Al realizar cortes transversales y longitudinales en los tallos y ramas puede observarse necrosis interna en forma de puntos negros concéntricos y estrías de marrón oscuro a negro.

Las especies de la familia Botryosphaeriaceae se encuentran dentro del grupo de los Ascomicetos (Schoch et al., 2006). Alrededor de 32 especies de esta familia causan la enfermedad del decline o muerte regresiva por Botryosphaeria, que ocasiona un crecimiento reducido, hojas pequeñas y cloróticas. En las hojas provoca necrosis foliar de manera sectorial y de forma central en la madera. Los brazos de la vid en estados de enfermedad más avanzados tienden a morir (Castillo-Pando et al., 2001). De forma externa en el tronco aparecen partes necróticas en las que la corteza aparece suelta y cuando se hacen cortes en la madera se pueden apreciar canchales en forma de cuña (Van Nierkerk et al., 2002).

Los hongos penetran a las plantas a través de las heridas de poda. El patógeno puede entrar de forma directa al xilema de la planta a través de heridas, especialmente las de poda, por lo que algunas de las prácticas más comunes para evitar el riesgo de infección es reducir las fuentes de inóculo, así como el uso de fungicidas u organismos de control biológico sobre las heridas de poda.

En México se han identificado varias especies de la familia Botryosphaeriaceae de canchros de plantas de vid. *Lasiodiplodia exigua* fue la especie más frecuentemente aislada en Baja California y Sonora, mientras que *L. brasiliensis* fue la especie más virulenta en los ensayos de patogenicidad (Rangel-Montoya et al., 2021).

1.1.3 *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrol

Los hongos del género *Trichoderma* se clasifican dentro de los Ascomicetos, en el orden Hypocreales de la familia Hypocreaceae (Waghunde et al., 2016). Se han usado ampliamente como agentes de biocontrol desde 1920. Recientemente, debido al daño ambiental generado por el uso de sustancias químicas para el control de enfermedades en cultivos, se ha motivado el uso de alternativas biológicas, como el uso de especies del género *Trichoderma*. Este hongo es capaz de producir elicitores que inducen la defensa vegetal contra patógenos e insectos, ayudan a la solubilización de fósforo y propician la síntesis de sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Djonovic et al., 2007; Hohmann et al., 2011).

También, mejora el crecimiento y desarrollo de las plantas, y tiene la capacidad de crecer en condiciones adversas, además de competir contra otros patógenos por nutrientes en la rizosfera y establecerse por encima de ellos (Harman et al., 2004; Pandya et al., 2011). *Trichoderma* no solo se ha caracterizado por su uso como bioinoculante y como agente de biocontrol, sino también por su capacidad de generar enzimas capaces de degradar residuos orgánicos sólidos, por lo que puede coadyuvar en la mineralización y en la reutilización de los residuos (Diorio et al., 2003; Idris et al., 2017).

Adicionalmente, *Trichoderma* tiene la capacidad de secretar enzimas extracelulares y proteínas como glucanasas, proteasas y quitinasas que degradan las paredes celulares de los hongos. Estas moléculas son importantes en el proceso de parasitar a hongos patógenos (Harman et al., 2004).

A partir de los metabolitos secundarios, proteínas, y enzimas producidos de forma natural por *Trichoderma*, que se obtienen en forma de un sobrenadante del cultivo líquido del hongo, es posible llevar a cabo una síntesis verde de nanopartículas, las cuales se espera que tengan capacidad antifúngica mejorada.

1.1.4 Nanopartículas

Las nanopartículas se ubican dentro del rango de tamaño de 1 – 100 nm (Farias et al., 2014), y este tamaño es el que les confiere sus características únicas de toxicidad y biocontrol. La síntesis de las nanopartículas puede realizarse por procedimientos físicos y químicos, pero estos producen subproductos tóxicos que son peligrosos para el medio ambiente (Muhammad y Rida, 2017), por lo que se ha propuesto el uso de la síntesis verde de nanopartículas debido a que son más amigables con el medio ambiente (Li et al., 2011), además de proveer características mejoradas de biocontrol con base al extracto del organismo que se utilice.

Como ha sido reportado en diversos artículos, las nanopartículas tienen la capacidad de reducir o eliminar microorganismos patógenos, y una de las aplicaciones de las NPs metálicas es como agentes antimicrobianos, ya que los elementos ZnO, Cu, Ag y Fe son antagonistas de una diversidad de microorganismos, como hongos y bacterias fitopatógenos (Saharan et al., 2015). De todos estos elementos, la plata y el cobre tienen mayor relevancia en cuanto a propiedades antifúngicas y antibacterianas (Ingle et al., 2014), por lo que, para combatir a especies patógenos de la vida se podrían emplear nanopartículas de cobre (CuNPs), las cuales tienen un menor impacto ecológico (Ahmed et al., 2016). Además, el cobre es más barato y se puede disponer más fácil por lo que realizar su síntesis es más sencillo. Otra ventaja de las CuNPs es que pueden mezclarse con mayor facilidad y estabilidad con polímeros y macromoléculas (Cioffi et al. 2005).

1.1.5 Propiedades antifúngicas de las nanopartículas

En las últimas décadas, las CuNPs han sido investigadas para su uso en aplicaciones biotecnológicas para el combate de distintos patógenos. Como antibacterial, han probado ser efectivas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Schrand et al. 2010). También se han propuesto como antivirales, como por ejemplo contra el virus H1N1, ya que el virus disminuyó con una concentración de 17 g/mL al 50% durante 60 minutos, siendo esta la dosis efectiva (Fujimori, *et al.*, 2012).

También se ha utilizado como anti-algal, contra algunas cepas de algas verdes, cianobacterias y diatomeas (Anyago et al., 2008). En concentraciones bajas, las CuNPs no son tóxicas para los seres humanos y trabajan de forma selectiva contra algunos microorganismos (Savithamma et al., 2011). Su uso como agente antifúngico ha sido estudiado contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, y *Candida albicans*, donde

la mayor inhibición fue reportada contra *Candida albicans* y la mínima contra *Aspergillus flavus* (Ramyadevi et al., 2012).

También se ha reportado que con una concentración del 1.5% de CuNPs, se logra una inhibición máxima de *Aspergillus niger* y que la inhibición es dependiente de la dosis o concentración que se use (Mali et al., 2020). Las CuNPs biosintetizadas con extractos de hoja de *Celastrus paniculatus* de 2 – 10 nm, con morfología esférica y monodispersas, fueron efectivas frente a hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* a una concentración de 0.24%, logrando inhibición en placa del 76.29 ± 1.52 (Mali et al., 2020). Nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) con un tamaño medio de 80 ± 15 nm y de forma irregular, demostraron tener inhibición contra *Alternaria mali*, *Diplodia seriata* y *Botryosphaeria dothidea*, con una tasa de reducción de crecimiento proporcional a la fracción utilizada en el medio (Ahmad et al., 2020). En particular, las CuONPs mostraron una actividad mejorada en combinación con el extracto de hoja de Neem (Ahmad et al., 2020).

En otro trabajo, CuNPs estabilizadas con quitosano tuvieron actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas y antifúngica contra levaduras. La mejor inhibición se observó contra las especies *Staphylococcus aureus*, resistente a meticilina (99.65%) y *Candida albicans*, (82.2%) usando CuNPs con quitosano al 0.05% y 0.1% de peso (Usman et al., 2013).

En un estudio en el que se evaluó la actividad antifúngica de CuNPs sintetizadas por *Streptomyces griseus* contra *Poria hypolateritia*, causante de la pudrición de la raíz roja en las plantas de té, se obtuvieron nanopartículas polidispersas de tamaño entre 5 a 50 nm de diámetro y de forma esférica, las cuales tuvieron un control máximo con una dosis de 2.5 ppm con una reducción de la enfermedad del 52.7%. Además, en ese trabajo evaluaron el efecto de las NPs en la rizosfera en plantas de té, donde después de 12 meses, hubo una disminución del 10% en la densidad de población de microorganismos debido a la presencia de las NPs (Ponnusamy et al., 2016).

1.1.6 Obtención de nanopartículas por medio de especies de *Trichoderma*

La síntesis verde por hongos para la fabricación de nanopartículas proporciona un método de escalado fácil y sencillo, además de ser más económico, proporciona una mayor cantidad de biomasa y obtención óptima de micelio del hongo (Varshney et al., 2012). Las especies de *Trichoderma* han sido ampliamente utilizadas para realizar síntesis de nanopartículas, de las cuales dependiendo del método que se utilice, se

obtienen nanopartículas de distintas características tanto morfológicas como fisicoquímicas (Varshney et al., 2012).

Guilger y colaboradores (2019) realizaron una biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNPs), a partir de un cultivo de *Trichoderma harzianum* del que se obtuvieron discos de micelio que transfirieron a caldo de papa-dextrosa. Realizaron dos cultivos, uno que estimularon con 0.5% de pared celular de *Sclerotinia sclerotium* y otro sin estimular. De esta manera obtuvieron dos tipos de nanopartículas, las que se obtuvieron con cultivos estimulados (AgNP-TS) y con cultivos no estimulados (AgNP-T). Mediante ensayos de inhibición en placa determinaron que las AgNP-TS tenían una mayor inhibición de crecimiento miceliar. También realizaron un ensayo de inhibición de crecimiento de *T. harzianum* en placa contra las AgNPs, en el que demostraron que no causaban ningún efecto en el crecimiento de *T. harzianum*.

En otro estudio, se utilizó la biomasa de *Trichoderma viridie* obtenida después de mantenerse a 25°C a 150 rpm por siete días, del cual se extrajo un filtrado crudo libre al que se agregó AgNO₃ para sintetizar las AgNPs. Estas nanopartículas fueron utilizadas para medir el efecto antibacterial contra *Acinetobacter baumannii*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii* y *Salmonella typhimurium*. Las bacterias Gram-negativas tuvieron zonas de inhibición más grandes en comparación de las Gram-positivas (Andallah et al., 2016).

Trichoderma longibrachiatum fue usada para la síntesis de AgNPs en contra de los hongos patógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus heteromorphus*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium brevicompactum*, *Heterodera oryzae* y *Pyricularia grisea*. Para la biosíntesis de las AgNPs se utilizaron los filtrados de la biomasa fúngica, usando como metal precursor nitrato de plata (AgNO₃). Con las AgNPs obtenidas, se realizó un ensayo de inhibición contra los hongos patógenos, donde la mayor eficiencia de inhibición se obtuvo contra *P. grisea* del 98.9%, seguida del 93% contra *A. alternata*, y la menor eficiencia fue de 75.7% contra *P. glabrum* (Elamawi et al., 2018). Debido a las características que tiene *Trichoderma*, se pretende utilizar como productor de nanopartículas de cobre, las cuales en conjunto con los metabolitos que produce, actuarán en sinergia permitiendo un control más efectivo de especies del género *Lasiodiplodia* en cultivos de la vid.

1.2 Justificación

Los hongos causantes de la muerte regresiva en vid ocasionan pérdidas económicas importantes en todo el mundo, ya que una vez que infectan la planta es difícil controlar la enfermedad. Estos hongos infectan

a la planta principalmente penetrando por las heridas de poda y, actualmente no existe un método de control efectivo. Con el uso de la nanotecnología se pretende desarrollar una alternativa contra los patógenos de la madera de la vid, aprovechando las propiedades antifúngicas de las nanopartículas de óxido de cobre y el potencial antifúngico de *Trichoderma*.

1.3 Hipótesis

Las nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas utilizando extractos de *Trichoderma* spp. tienen capacidad inhibitoria contra los hongos causantes de la muerte regresiva en vid.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Obtener nanopartículas de óxido de cobre a partir de extractos de *Trichoderma* spp. y evaluar su efecto sobre especies de hongos causantes de la muerte regresiva en vid.

1.4.2 Objetivos específicos

- Estandarizar un protocolo de síntesis para biosintetizar nanopartículas de óxido de cobre utilizando *Trichoderma* spp.
- Obtener la caracterización y determinar la estabilidad de las nanopartículas de óxido de cobre obtenidas a partir de *Trichoderma* spp.
- Evaluar el efecto de las nanopartículas de óxido de cobre sobre cultivos *in vitro* del hongo patógeno *Lasioidiplodia gilaniensis* CHCS3-3.
- Evaluar el efecto de las nanopartículas de óxido de cobre *in planta* sobre el hongo patógeno *Lasioidiplodia brasiliensis* MXBCL28.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Crecimiento de especies de *Trichoderma* y *Lasiodiplodia*

Las cepas de *Trichoderma asperellum* que se eligieron para este experimento fueron la *Trichoderma* EF09, *Trichoderma* T11 y *Trichoderma* T15 (Fig. 1). La EF09 se obtuvo de vid cv. Misión del Valle de Guadalupe. La T11 fue obtenida de clavel y la T15 se obtuvo de una vid y fue aislada en Sonora. Las cepas se colocaron en una caja Petri de 120 mm de diámetro, inoculando en el centro con un disco de micelio. Se sellaron y mantuvieron en incubación por tres días a 30°C y dos días en luz para la formación de conidios. Transcurridos los cinco días, se colocaron los conidios de las tres cepas de *Trichoderma* en un tubo Eppendorf con glicerol para mantener un resguardo de las cepas.

Tabla 1. Características generales de *Trichoderma* spp. que lo hacen un buen organismo de biocontrol contra hongos fitopatógenos.

<i>Trichoderma</i> spp.	
Filo	Ascomicota - Hongos que se caracterizan por sus ascas, una estructura en forma de saco que se desarrolla en su fase sexual.
Clase	Sordariomicetes - Los sordariomicetos generalmente producen sus ascas en cuerpos fructíferos periteciales.
Orden	Hipocreales - Hongos con esferáceas de colores brillantes en sus estructuras que producen esporas.
Familia	Hipocreaceae - Contiene especies con ascas periteciales de colores brillantes (rojo, amarillo, etc.).
Género	<i>Trichoderma</i>
Modo de acción	Micoparasitismo por medio de enzimas que pueden degradar la pared celular de algunos hongos. Antibiosis por la secreción de metabolitos secundarios que afectan a otros hongos parásitos y por competencia en la rizosfera contra otros microorganismos.

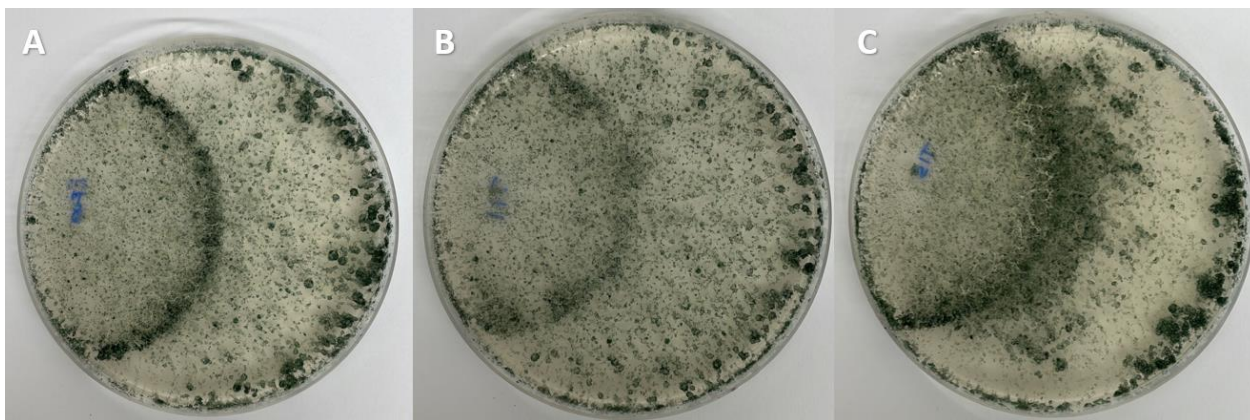


Figura 1. Morfología en placa de cepas de *Trichoderma asperellum* EF09, *Trichoderma asperellum* T11 y *Trichoderma asperellum* T15, recuperadas y sembradas para utilizar durante el experimento. Foto a caja abierta en el que se ve color verdoso debido a esporulación densa.

Como patógeno, se eligió la cepa de *Lasiodiplodia gilaniensis* CHCS3-3 (Figura 2), y la *Lasiodiplodia brasiliensis* MXBCL28, previamente aisladas de viñedos de Baja California (Rangel-Montoya et al., 2021). Se inoculó con un disco de micelio en el centro de una caja Petri con agar papa dextrosa (PDA) y se mantuvo durante cinco días en incubación a 30 °C. Transcurridos los cinco días, se colocó micelio en un tubo Eppendorf con glicerol y se mantuvo en resguardo hasta su uso.

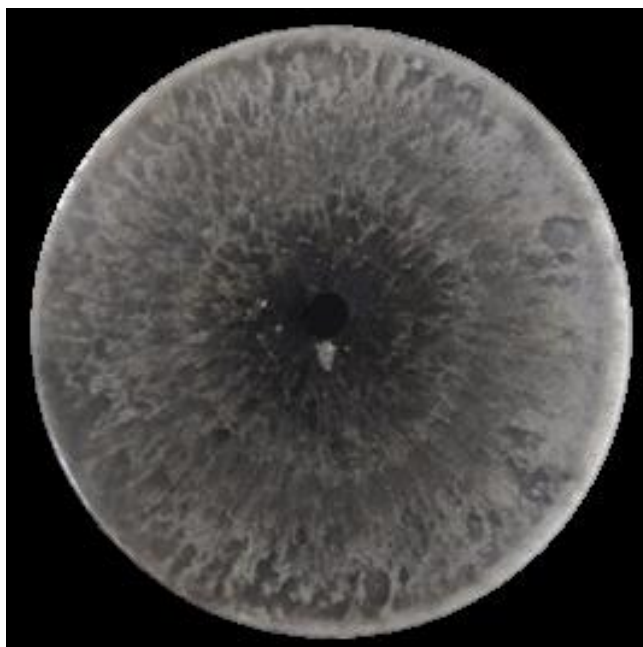


Figura 2. Morfología en placa de *Lasiodiplodia gilaniensis* CHCS3-3 crecida en medio agar papa dextrosa (PDA) utilizada en este trabajo.

2.2 Preparación de la biomasa fúngica para la elección de medio y biosíntesis de CuONPs

Se utilizaron dos medios de cultivo líquido para seleccionar aquel que indujera una mayor producción de metabolitos secundarios en las cepas de *Trichoderma*. Los medios fueron caldo de extracto de malta (MEB) y caldo de papa dextrosa (PDB), con y sin quitina, por lo tanto, se obtuvieron cuatro medios en total: caldo de papa dextrosa (PDB), caldo de papa dextrosa con quitina al 0.3% (PDB+Q); caldo de extracto de malta (MEB), caldo de extracto de malta con quitina al 0.3% (MEB+Q). Se colocaron 100 mL del medio correspondiente en matraces de 250 mL, cada medio fue inoculado con 100 μ L de las cepas de *Trichoderma* (EF09, T11 y T15), a una concentración de 1×10^4 esporas/100 mL y se mantuvieron en agitación por nueve días a 150 rpm a 30 °C. Como controles para los experimentos se utilizaron 100 mL de cada medio (PDB, PDBQ, MEB y MEBQ), sin inocular.

Transcurridos los nueve días, se separó el sobrenadante de la biomasa decantando el líquido en tubos de 50 mL y se centrifugó a 4,000 rpm a temperatura ambiente (TA) por 10 min. Esto se hizo para separar los restos de micelio que aún permanecían en el sobrenadante y que, al momento de realizar el filtrado no se taponara el filtro.

Después de centrifugar todos los sobrenadantes, se procedió a filtrar las muestras usando un filtro de 0.22 μ m con una jeringa de 20 mL, para así obtener los sobrenadantes filtrados (S1). Las muestras obtenidas se resguardaron en refrigeración para su uso posterior.

2.3 Elección del medio de cultivo para producción de metabolitos secundarios

A partir de los S1 obtenidos de las tres especies de *Trichoderma*, se realizó un experimento de inhibición por envenenamiento. Para ello, en una placa Petri de 60 mm se agregaron en total 9 mL de medio conteniendo 30% fue sobrenadante y 70% de PDA. Debido a que se necesitaba tener una homogeneidad en toda la placa de agar y sobrenadante, antes de ser colocados sobre la caja Petri, se agregaron 2.7 mL de sobrenadante y 6.3 mL de agar en un tubo de 15 mL y se mezclaron agitando levemente el tubo de un lado al otro, para evitar la formación de burbujas que podrían interferir en el crecimiento del hongo patógeno en la caja. A continuación, se vertieron los 9 mL de líquido en la caja Petri, colocando la tapa a

la mitad en lo que el agar se endurecía, evitando la formación de vapor de agua que interfiriera con el experimento.

Después de 20 min, sobre el agar sólido se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro del patógeno *Lasiodiplodia gilaniensis* CHCS3-3, en el centro de la placa para que tuviera crecimiento equitativo hacia los extremos. Para mantener la esterilidad de las muestras, todo se realizó con mechero y en campana de flujo laminar.

Las cajas se sellaron y colocaron en incubación a 30 °C para ser evaluadas a las 24 y 48 h para medir el crecimiento del hongo patógeno sobre la caja Petri. A partir de este experimento se eligieron los sobrenadantes con mayor inhibición para la formación de nanopartículas. De este experimento se seleccionó el medio en donde se observó mayor inhibición del hongo patógeno, considerando que la inhibición se debe a una mayor producción de metabolitos secundarios.

2.4 Biosíntesis de CuONPs a 5 mM

Con los sobrenadantes S1 de las especies de *Trichoderma* con mayor inhibición, se prepararon 36 mL de nanopartículas para hacer posteriores ensayos de inhibición y caracterización. Como precursor metálico de las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs), se utilizó sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Se preparó una solución de sulfato de cobre a 5 mM, y una solución de hidróxido de sodio (NaOH) a 5 mM para realizar el ajuste de pH pertinente. A cada S1, se le agregó la solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en proporción de 1:3 (sobrenadante:sulfato de cobre), por lo que, para cada síntesis de nanopartícula, se agregaron 9 mL del sobrenadante y 27 mL $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. El pH para la formación de las CuONPs ronda los entre los 8-11, por lo que fue necesario realizar ajustes de pH con el NaOH. Posteriormente las CuONPs se resguardaron en oscuridad en un vial de vidrio de 20 mL hasta su uso.

2.5 Actividad antifúngica de las CuONPs sintetizadas en ensayos *in vitro*

Para medir la actividad antifúngica de las nanopartículas de cobre, se realizó un ensayo *in vitro* en placa en contra de *L. gilaniensis* CHCS3-3. Se prepararon placas de Petri con medio PDA, que contenían por separado; 1. Las nanopartículas de cobre biosintetizadas con los S1 de *Trichoderma* seleccionados, 2. El

sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a una concentración de 5 mM, 3. El control del experimento, con el medio de cultivo PDA sin las nanopartículas ni el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Una vez se tuvieron listas las placas de Petri, se inoculó en el centro de la placa con el hongo patógeno *L. gilaniensis* CHCS3-3 para cada ensayo y se mantuvieron en incubación a 28 °C por 30 h. Durante las 30 h que duró el experimento, se midió el crecimiento de micelio para todos los ensayos y elaboró una tabla con los datos obtenidos.

2.6 Preparación de cultivo de *Trichoderma*

A partir de las cepas de *Trichoderma* seleccionadas, se obtuvo más sobrenadante para los siguientes experimentos.

Usando 100 mL de medio de cultivo previamente seleccionado se inocularon esporas de *Trichoderma* a una concentración de 1×10^4 , en matraces de 250 mL. Posteriormente, se mantuvieron en incubación por nueve días a 150 rpm a 30 °C. Transcurridos los nueve días, se separó la biomasa del sobrenadante con ayuda de un filtro de tela tipo magitel estéril. La biomasa se pesó y resguardó para utilizarla más adelante. El sobrenadante obtenido, se filtró utilizando un filtro estéril de 0.22 μm usando una jeringa de 20 mL, para así obtener los sobrenadantes filtrados (S1). Las muestras se resguardaron en refrigeración para su posterior uso.

La biomasa previamente obtenida, se lavó y se pesó y por cada 10 g de micelio, se añadieron 100 mL de H_2O desionizada estéril en matraces de 250 mL, para ser nuevamente incubada por tres días a 150 rpm a 30 °C. Transcurridos los tres días, se filtró el sobrenadante obtenido por filtro Whatman del 0.22 μm con una jeringa de 20 mL, para así obtener los sobrenadantes a partir de micelio limpio (i.e. libre de restos de nutrientes) (S2). Las muestras se resguardaron en refrigeración para su uso posterior.

2.7 Biosíntesis de CuONPs a 10 mM

Los S1 y S2 se usaron para sintetizar nanopartículas a partir de una concentración de 5 mM, se decidió aumentar a 10mM para ver si se podía lograr mayor inhibición de los hongos patógenos.

De los dos sobrenadantes previamente obtenidos (S1 y S2), se realizó la síntesis de nanopartículas con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como precursor a 10 mM y se realizó el ajuste de pH a 11 con NaOH 1M.

Para los S1, se realizó la síntesis con una relación de 1:3 como se había realizado anteriormente, donde por cada 1 mL de S1 se agregaban 3 mL del metal precursor. Para los S2, la síntesis se realizó con una relación de 1:1 debido a que en esa relación las nanopartículas mantenían mayor estabilidad, e igualmente el ajuste de pH se realizó con NaOH 1M. La formación de NPs se confirmó con el cambio de viraje de un amarillo pálido a un azul que varió dependiendo de la muestra. Al final se obtuvieron seis tipos de nanopartículas, las obtenidas por los S1 (S1 CuONPs), y las obtenidas por S2 (S2 CuONPs). Las nanopartículas obtenidas se resguardaron en viales de vidrio y se mantuvieron en oscuridad por 24 h a TA para ver su estabilidad.

2.8 Actividad antifúngica de las CuONPs a 10 mM

Se probó la actividad antifúngica de las CuONPs en un experimento en conjunto con los S1 y S2 por medio de ensayos *in vitro* en placa en contra de una especie de *L. gilaniensis* CHCS3-3.

Se prepararon placas de Petri con medio PDA, que contenían por separado; 1. El S1 obtenido previamente, 2. El sobrenadante de S2, 3. Las CuONPs biosintetizadas con los S1 de *T. asperellum* PQ09, PT15 y PQT15, 4. Las CuONPs biosintetizadas con el S2 de *T. asperellum* PQ09, PT15 y PQT15, 5. El sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a una concentración de 10 mM, y 6. El control del experimento, con el medio de cultivo PDA sin las nanopartículas ni el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Una vez se tuvieron listas las placas de Petri, se inoculó en el centro de la placa con el hongo patógeno *L. gilaniensis* CHCS3-3 para cada ensayo y se mantuvieron en incubación a 30 °C. Cada 24h, se observaron las placas para medir el crecimiento de micelio en todos los ensayos y así poder realizar una tabla con los datos obtenidos y poder comparar los resultados.

2.9 Preparación de muestras para caracterización y estabilidad de las CuONPs

Se realizaron tres métodos para caracterizar y ver la estabilidad de las CuONPs EF09. De un vial con nanopartículas, se tomó 1 mL en un microtubo de 1.5 mL y se hizo una dilución 1:10 en agua desionizada

para no cambiar el pH del medio. Posteriormente, la suspensión de nanopartículas se sonicó por 40 minutos a temperatura ambiente. A partir de esta suspensión, se determinó el potencial z de las nanopartículas por dispersión de luz dinámica (DLS), lo cual permite saber la carga superficial de las nanopartículas, y con ello, determinar su estabilidad, si se aglomeran o tienen repulsión entre ellas. También se realizó espectroscopía ultravioleta – visible (UV – Vis). Se realizó la medición de 250 nm a 600 nm. Por último, para ver la morfología y el tamaño de las nanopartículas, se realizó microscopía electrónica de transmisión.

2.10 Actividad antifúngica de las CuONPs en planta

Se realizó un primer experimento utilizando plantas de vid cv. Cabernet Sauvignon y se seleccionó la cepa MXBCL28 de *L. brasiliensis* como patógeno. Se evaluó el efecto del sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 10 mM, el sobrenadante previamente obtenido de *T. harzianum* EF09 (S1), las esporas de la EF09 a una concentración de 1×10^6 /mL, las CuONPs EF09, tanto por separado como en combinación con el patógeno *L. brasiliensis*. Para las plantas control se usó agua estéril. Las plantas se inocularon con 10 μL de cada tratamiento en una herida mecánica de 2 mm de diámetro realizada con un taladro en el tejido leñoso de la planta y se dejó transcurrir 1 h hasta que las soluciones se absorbieron en el interior de la planta. Posteriormente, el patógeno se inoculó usando un disco micelial de un cultivo de tres días en PDA de *L. brasiliensis* en la herida. Las heridas se cubrieron con Parafilm y se mantuvieron en condiciones de invernadero por dos meses. Transcurrido el tiempo, se cortó la base de la planta y se realizaron cortes longitudinales para observar y medir las lesiones causadas por la *L. brasiliensis* en la zona de inoculación, así como el efecto de los tratamiento por separado. Después, se recuperó un trozo de la zona de la planta infectada, se flameó con etanol al 95%, se inoculó con PDA y se incubó a 30 °C. Al día siguiente, se observaron los diferentes tratamientos recuperados en las cajas con PDA para ver si se había recuperado al hongo *L. brasiliensis*.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Preparación de la biomasa fúngica

Después de los nueve días de incubación de los cultivos se obtuvo la biomasa. En los medios PDB, PDB+Q, MEB y MEB+Q, se observó un buen crecimiento de las tres cepas de *Trichoderma* (Figuras 3, 4 y 5).

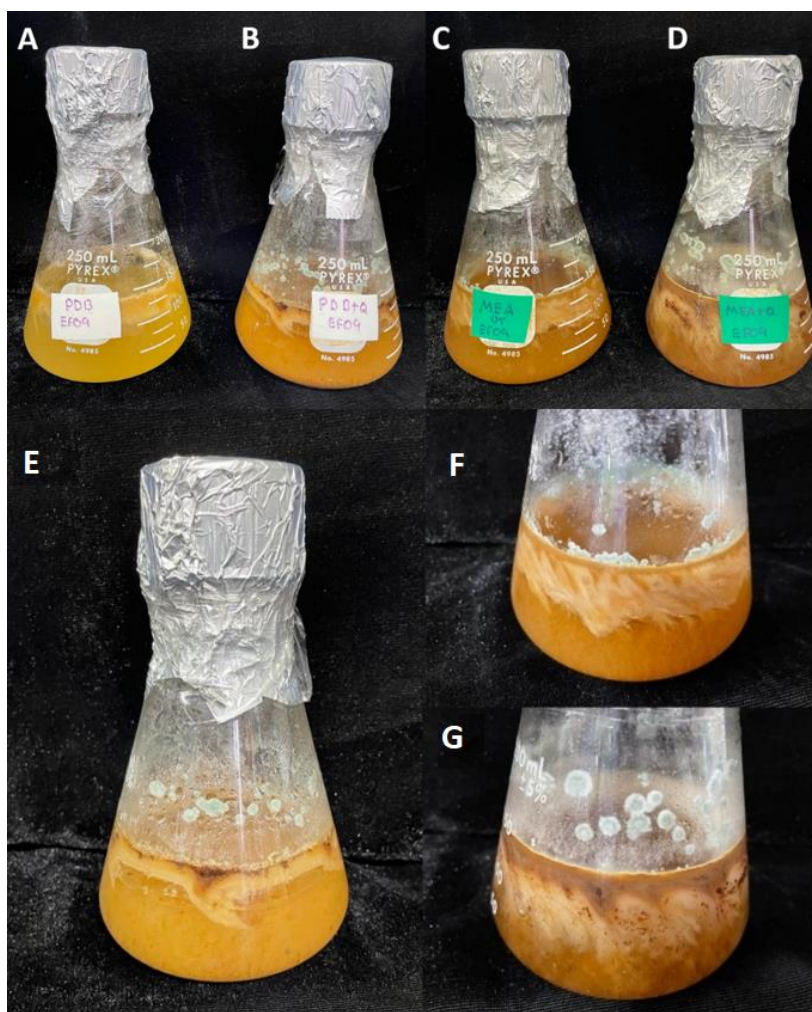


Figura 3. Producción de biomasa observado en la cepa de *Trichoderma asperellum* EF09 en medios PDB y MEB con y sin quitina. A) Medio PDB. B) Medio PDB+Q. C) Medio de cultivo MEB. D) Medio de cultivo MEB+Q. E-G) Medios en donde se observó mayor producción de biomasa. E) PDB+Q. B) Medio de cultivo MEB. C) Medio de cultivo MEB+Q.

La producción de biomasa en los cultivos con MEB y MEB+Q en las tres especies de *Trichoderma* fue mayor a comparación de los cultivos con PDB y PDB+Q, sin embargo, entre estos últimos dos, el medio PDB+Q produjo más biomasa que el PDB.

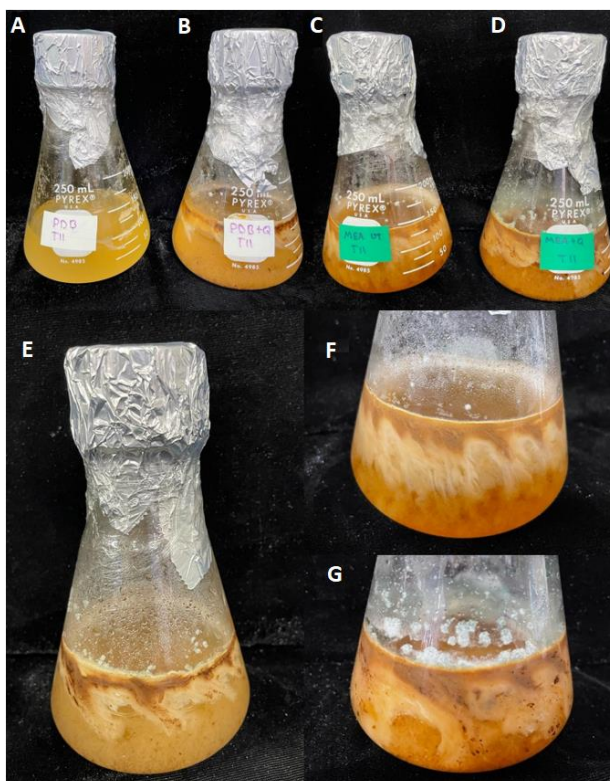


Figura 4. Producción de biomasa observado en la cepa de *Trichoderma asperellum* T11 en medios PDB y MEB con y sin quitina. A) Medio PDB. B) Medio PDB+Q. C) Medio de cultivo MEB. D) Medio de cultivo MEB+Q. E-G) Medios en donde se observó mayor producción de biomasa. E) PDB+Q. B) Medio de cultivo MEB. C) Medio de cultivo MEB+Q.

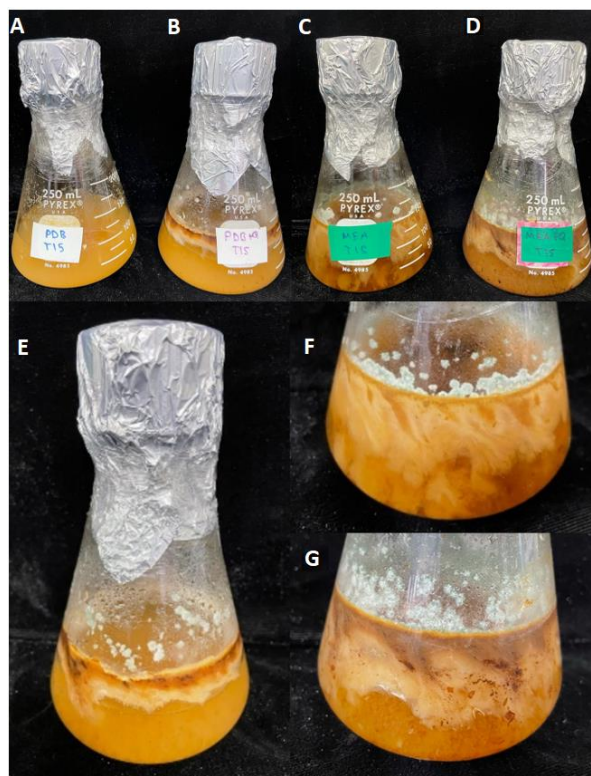


Figura 5. Producción de biomasa observado en la cepa de *Trichoderma asperellum* T15 en medios PDB y MEB con y sin quitina. A) Medio PDB. B) Medio PDB+Q. C) Medio de cultivo MEB. D) Medio de cultivo MEB+Q. E-G) Medios en donde se observó mayor producción de biomasa. E) PDB+Q. B) Medio de cultivo MEB. C) Medio de cultivo MEB+Q.

3.2 Selección del medio de cultivo para producción de metabolitos secundarios

Todos los S1 mostraron actividad antifúngica, retardando el crecimiento de micelio con respecto al control. El sobrenadante filtrado con mayor actividad antifúngica fue el de la PT15, seguido de la PQ09. Los sobrenadantes (S1): P09, PT11 sin quitina y PQT11, PQT15, MQT11 y MQT15 (con quitina), mostraron una inhibición similar del patógeno. Los S1: M09, MQ09, MT15 y MT11, tuvieron la menor inhibición. Este comportamiento se mantuvo durante el tiempo que duró el experimento (Figuras 6 y 7).

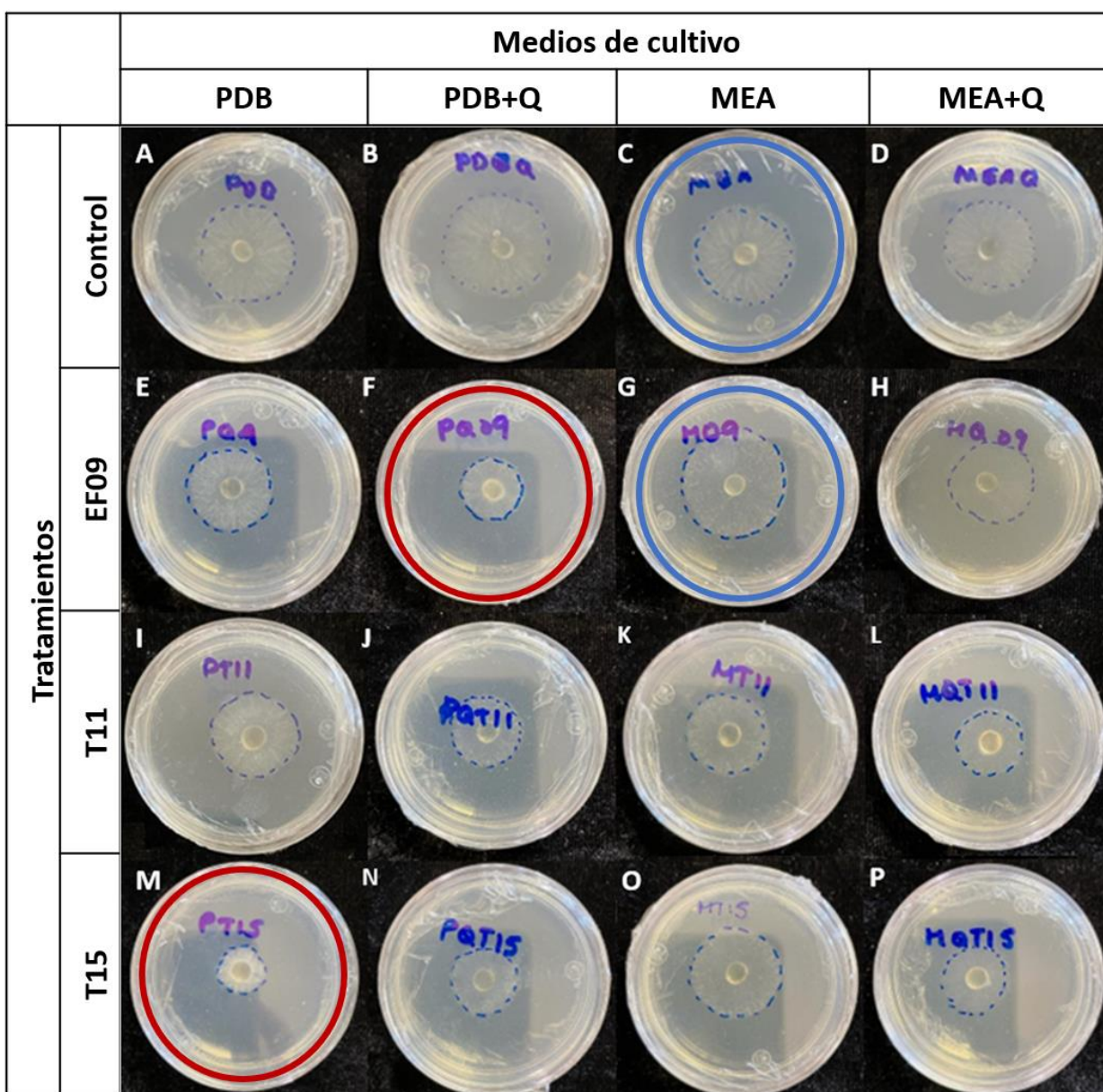


Figura 6. Efecto de los sobrenadantes de las distintas cepas de *Trichoderma asperellum* sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia gilaniensis* CHCS3-3 a las 24 horas de incubación. Los círculos rojos indican tratamientos con mayor inhibición, mientras que los círculos azules indican tratamientos con menor inhibición.

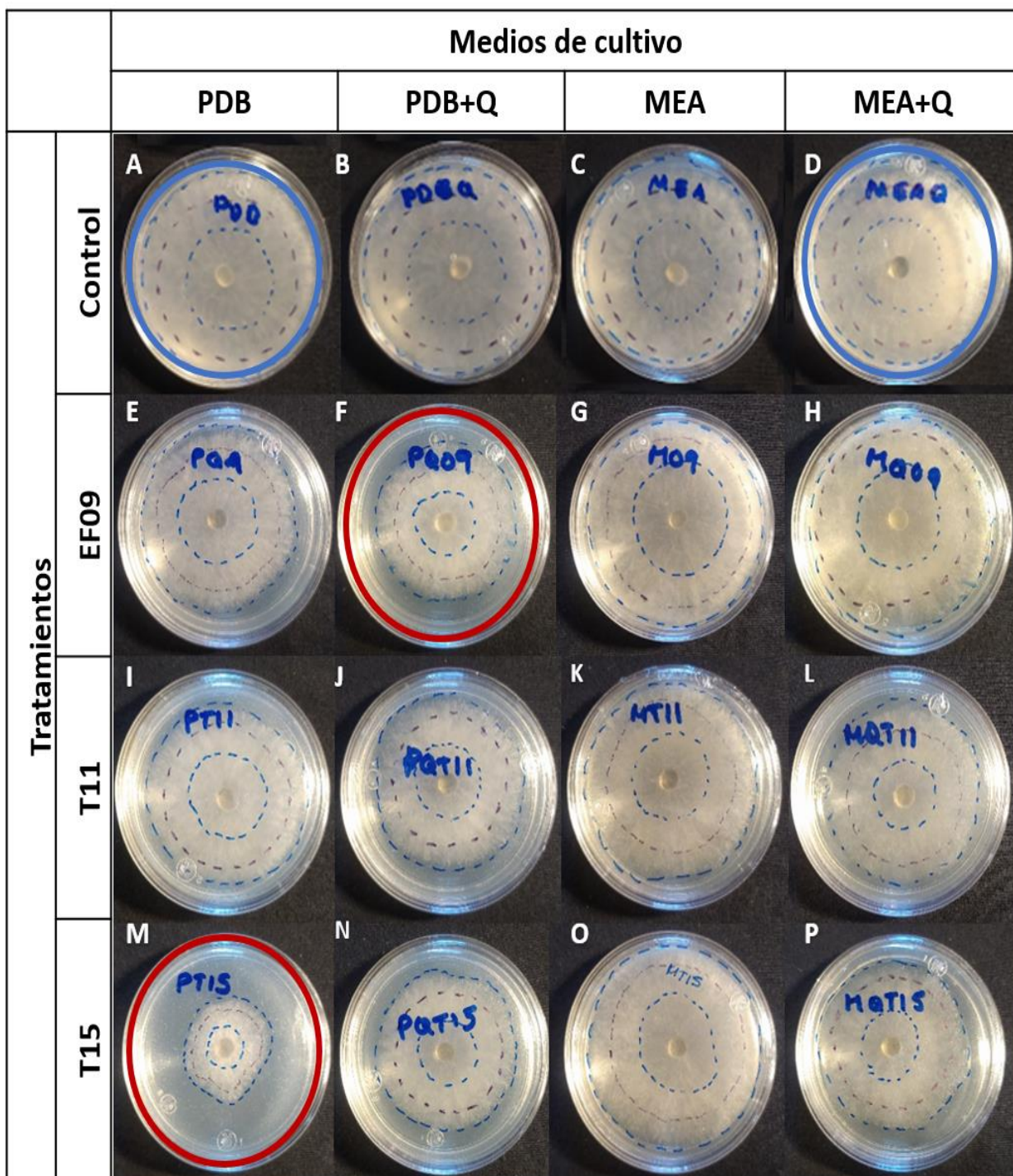


Figura 7. Efecto de los sobrenadantes de las distintas cepas de *Trichoderma asperellum* sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia gilaniensis* CHCS3-3 a las 34 horas de incubación. Los círculos rojos indican tratamientos con mayor inhibición, mientras que los círculos azules indican tratamientos con menor inhibición.

Con base en el área promedio medida en los diferentes tratamientos con los sobrenadantes S1, el sobrenadante PT15 fue el que tuvo la mayor inhibición de crecimiento, seguido por el S1 PQ09, y PQT15.

Los sobrenadantes con el medio PDB – PDB+Q en promedio tuvieron mayor inhibición que los S1 con el medio MEB – MEBQ (Tabla 2 y Figura 8).

Tabla 2. Área promedio de crecimiento (media \pm desviación estándar, N=3), a diferentes tiempos de incubación de *Lasiodiplodia* CHCS3-3 en los distintos S1 de las cepas de *Trichoderma asperellum*.

Tratamientos	Área (mm ²)		
	18 horas	24 horas	34 horas
PDB	873 \pm 11	1823 \pm 70	2808 \pm 20
PDBQ	900 \pm 10	1836 \pm 34	2746 \pm 49
MEB	929 \pm 11	1857 \pm 47	2763 \pm 23
MEBQ	769 \pm 14	1655 \pm 30	2828 \pm 19
P09	559 \pm 17	1382 \pm 81	2310 \pm 64
PQ09	380 \pm 4	1094 \pm 74	1894 \pm 90
PT11	538 \pm 36	1615 \pm 130	2522 \pm 163
PQT11	552 \pm 109	1450 \pm 181	2408 \pm 235
PT15	203 \pm 26	544 \pm 53	874 \pm 53
PQT15	434 \pm 4	1138 \pm 117	2027 \pm 181
M09	960 \pm 29	2071 \pm 73	2768 \pm 46
MQ09	738 \pm 98	1801 \pm 136	2734 \pm 135
MT11	574 \pm 35	1612 \pm 219	2630 \pm 123
MQT11	416 \pm 12	1406 \pm 159	2281 \pm 141
MT15	705 \pm 29	1571 \pm 157	2613 \pm 183
MQT15	506 \pm 24	1461 \pm 85	2500 \pm 30

3.3 Biosíntesis de CuONPs

La formación de las nanopartículas fue observada por el cambio de coloración de los sobrenadantes con el CuSO₄·5H₂O, de un amarillo pálido a azul. Debido a que el pH ideal para la formación de las CuONPs es de 11, en la tabla 2 se muestra el pH inicial, final y cantidad de NaOH agregado para cada síntesis.

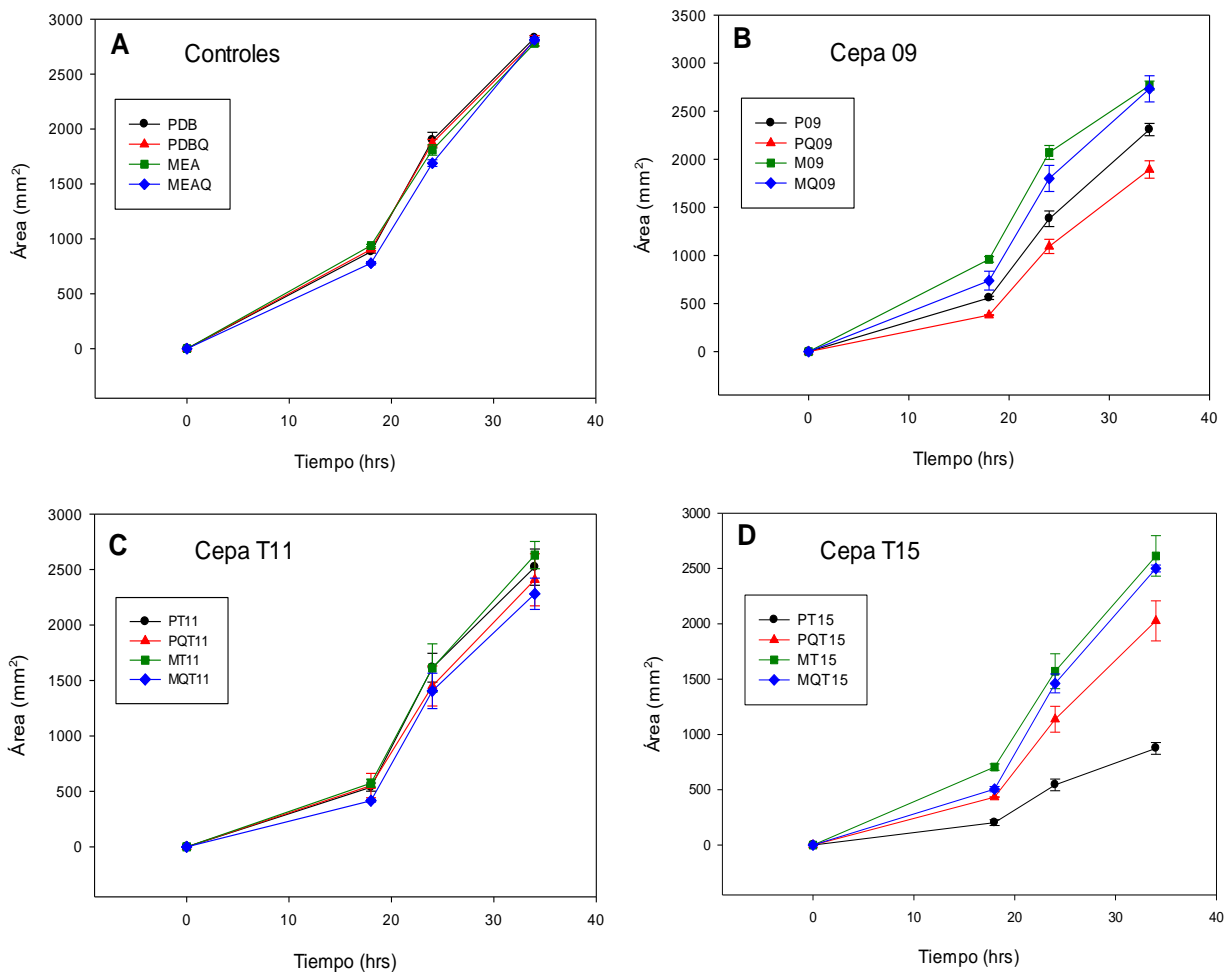
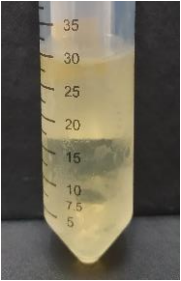
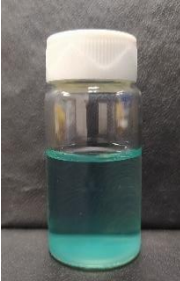
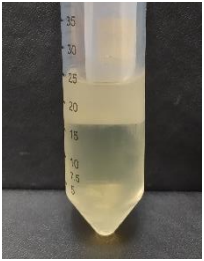

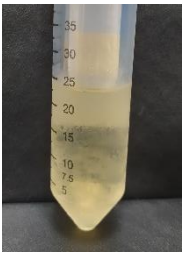

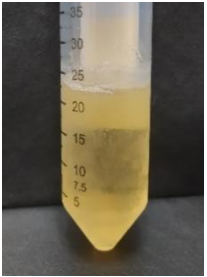
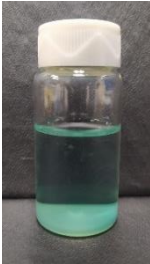


Figura 8. Crecimiento de *Lasiodiplodia gilaniensis* CHCS3-3 durante 34 h de incubación en los distintos sobrenadantes (S1) de las cepas de *Trichoderma asperellum*. **A)** Controles. **B)** Sobrenadante de la cepa *T. asperellum* EF09. **C)** Sobrenadante de la cepa *T. asperellum* T11. **D)** Sobrenadante de la cepa *T. asperellum* T15. En los tratamientos el medio PDB se indica con una P y el MEB con M. La presencia de quitina se indica con una Q. (N=3, media \pm desviación estándar).

En general, los valores medidos de pH de los sobrenadantes de las *Trichodermas* fueron bajos, siendo el sobrenadante de la PQT15 el de menor pH con 3.12, y el mayor de la PT15 con 5.58 (Tabla 3). Para llevar a cabo la formación de las nanopartículas fue necesario subir el pH hasta un valor de 11 donde ocurrió la formación de nanopartículas y el cambio de coloración en las soluciones, llegando a un azul intenso o azul verdoso dependiendo de la cepa utilizada. Este cambio de coloración fue más evidente tras 24 horas de permanecer a temperatura ambiente en oscuridad. Las nanopartículas de la P09 y PT11 se aglomeraron en la parte inferior de vial de vidrio mostraron color similar. Por su parte, la coloración de la PT15 y PQT15 fue más azul verdoso y tuvieron menor precipitación en el fondo (Tabla 3).

Tabla 3. Sobrenadantes seleccionados para realizar la síntesis de las CuONPs. Se muestra el pH inicial y final, además de la colorimetría de las muestras antes y después de llegar al pH de formación de las CuONPs.

Sobrenadante	Color inicial	pH inicial	NaOH 0.5M agregado	pH final	Color final
P09 <i>T. asperellum</i> EF09 cultivada en PDB	 Amarillo pálido	3.40	700μL	11.60	 Azul
PT11 <i>T. asperellum</i> T11 cultivada en PDB	 Amarillo pálido	3.49	700μL	11.81	 Azul
PT15 <i>T. asperellum</i> T11 cultivada en PDB	 Amarillo pálido	5.58	600μL	11.57	 Azul verdoso
PQT15 <i>T. asperellum</i> T15 cultivada en PDB con 0.3% de quitina	 Amarillo pálido	3.12	700μL	11.59	 Azul verdoso

3.4 Actividad antifúngica de las CuONPs sintetizadas en ensayos *in vitro*

Se realizó un ensayo por envenenamiento para el cual se seleccionaron las CuONPs de la PT15, PT11, PQT15 y PQ09. Los resultados obtenidos fueron similares entre las CuONPs seleccionadas, sin embargo, las nanopartículas de PT11 y PT15 mostraron más inhibición de la morfología de crecimiento del hongo patógeno (Figuras 9 y 10). El control negativo (C-) mostró mayor cantidad de micelio aéreo, con un crecimiento de las hifas ramificado y lineal, apuntando hacia la parte superior y llenando en su totalidad la placa en las 30 h que duró el experimento (Figuras 9A y 10A). El ensayo del control positivo (C+) con el metal precursor CuSO_4 apenas tuvo crecimiento de micelio, sin extenderse por la placa (Figura 9B y 10B). En las nanopartículas de PT15, el micelio parecía abultado y anormal (Figuras 9E, 9F, 10E y 10F). Por otra parte, con las nanopartículas de PT11 no se observó micelio aéreo de igual forma, el micelio presentaba estrés, creciendo en forma de “zigzag” (Figuras 9D y 10D), de manera más notable que con las nanopartículas de PT15. Tanto la P09 como la PQT15 tuvieron ligero crecimiento de hifas aéreas, con crecimiento anormal y desorganizado (Figura 9C, 9E, 9F, 10C, 10E y 10F). Con base en los resultados de las áreas de crecimiento del patógeno con las nanopartículas, las nanopartículas de P09 fueron las que más redujeron el crecimiento de *L. gilaniensis*, seguida de las nanopartículas de PT15, PT11 y por último la PQT15. Debido a que las nanopartículas de PT15 y PQ09 mostraron la mayor inhibición en el ensayo de selección de medio, se eligieron para realizar el ensayo en plantas (Tabla 4 y Figura 11).

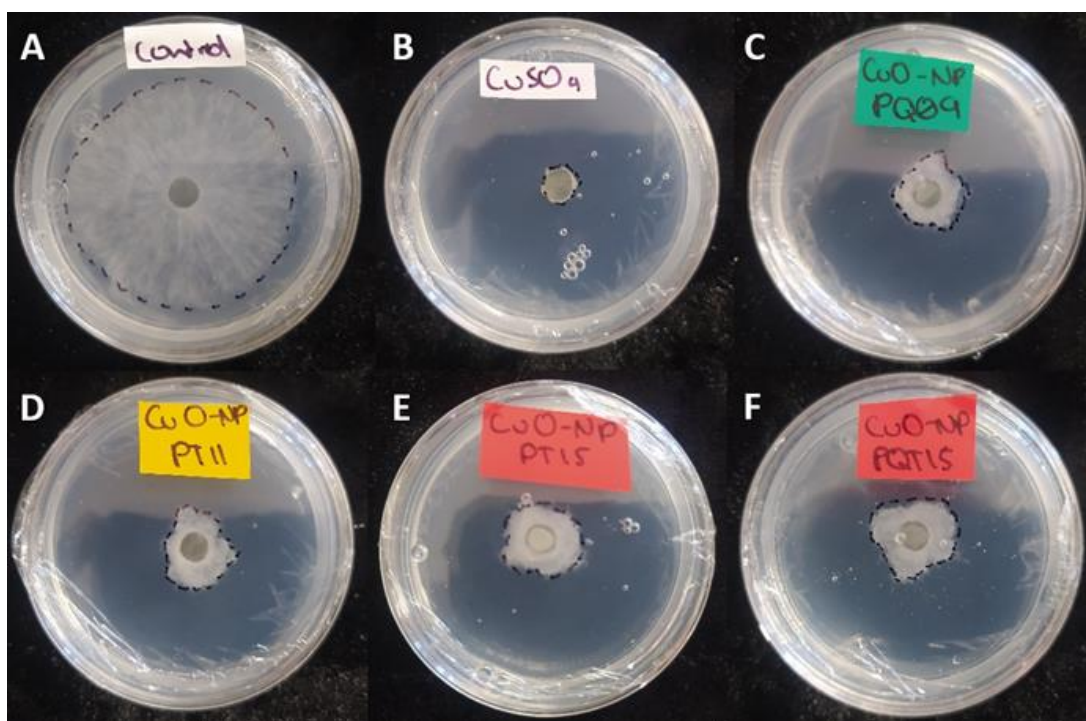


Figura 9. Inhibición del crecimiento de *Lasiodiplodia gilaniensis* CHCS3-3 por nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs), medido a las 18 horas de haber inoculado con el patógeno. **A.** Control. **B.** Sulfato de cobre 5 mM. **C.** CuONPs PQ09. **D.** CuONPs PT11. **E.** CuONPs PT15. **F.** CuONPs PQT15.

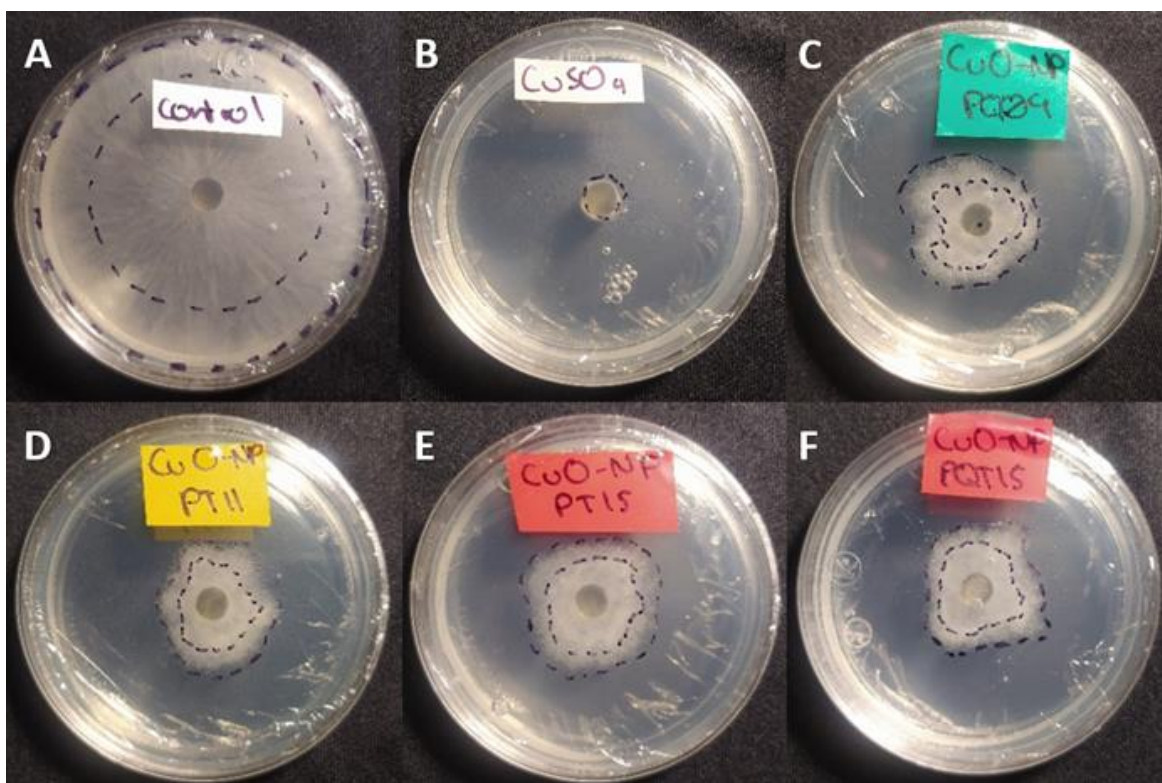


Figura 10. Inhibición del crecimiento de *Lasiodiplodia gilaniensis* CHCS3-3 por nanopartículas de óxido de cobre (CuONP), medido a las 30 horas de haber inoculado con el patógeno. **A.** Control. **B.** Sulfato de cobre 5 mM. **C.** CuONP PQ09. **D.** CuONP PT15. **E.** CuONP PT15. **F.** CuONP PQT15.

Tabla 4. Crecimiento de *Lasiodiplodia gilaniensis* CHCS3-3 (media \pm desviación estándar, N=3), en diferentes tratamientos. Áreas medidas con ImageJ.

Tratamientos	Área (mm ²)	
	18 horas	30 horas
Control	1726 \pm 191	2658 \pm 118
CuSO ₄	50 \pm 9	82 \pm 33
CuONP PQ09	198 \pm 26	473 \pm 48
CuONP PT11	257 \pm 48	552 \pm 108
CuONP PT15	257 \pm 25	541 \pm 64
CuONP PQT15	277 \pm 5	576 \pm 73

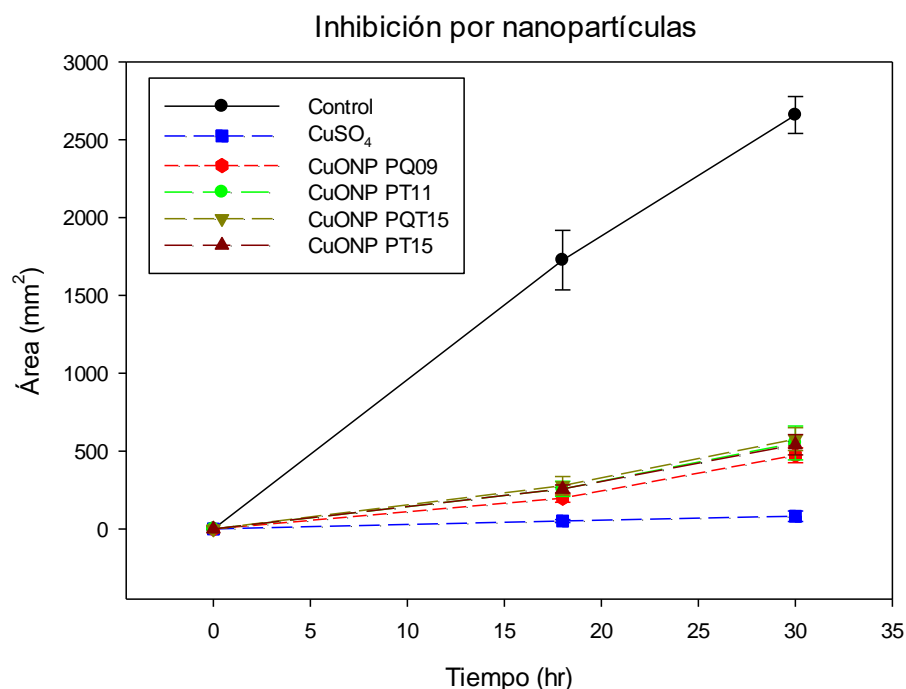


Figura 11. Crecimiento de *Lasiodiplodia gilaniensis* CHCS3-3 en ensayo de inhibición con nanopartículas. **A.** Control: *L. gilaniensis* CHCS3-3 en PDA. **B.** Sulfato de plata 5 mM. **C.** CuONP PQ09. **D.** CuONP PT15. **E.** CuONP PT15. **F.** CuONP PQT15. (N=3, media \pm desviación estándar).

3.5 Biosíntesis de CuONPs

La formación de las nanopartículas se confirmó con el cambio de viraje de amarillo pálido a un azul más fuerte que varió dependiendo la especie con su respectivo medio. Las nanopartículas producidas con el sobrenadante (S2), tuvieron un viraje más tenue en comparación con las producidas con S1. Al realizar la síntesis, las S2 – NP adquirieron un color azul el cual tras 24h, cambió a azul más claro. Por su parte, las S1 – NP tuvieron un viraje más intenso donde, la S1 NP – PQT15 fue la que mostró un color azul más intenso (Figura 12).

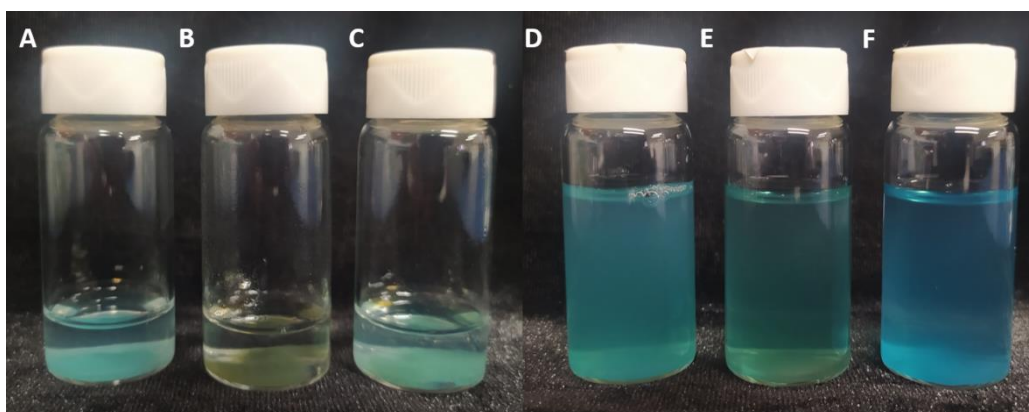


Figura 12. Viraje de las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs), sintetizadas con los sobrenadantes S1 y S2. **A.** S2 CuONP PQ09. **B.** S2 CuONP PT15. **C.** S2 CuONP PQT15. **D.** S1 CuONP PQ09. **E.** S1 CuONP PT15. **F.** S1 CuONP PQT15.

3.6 Actividad antifúngica de las CuO NPs a 10mM

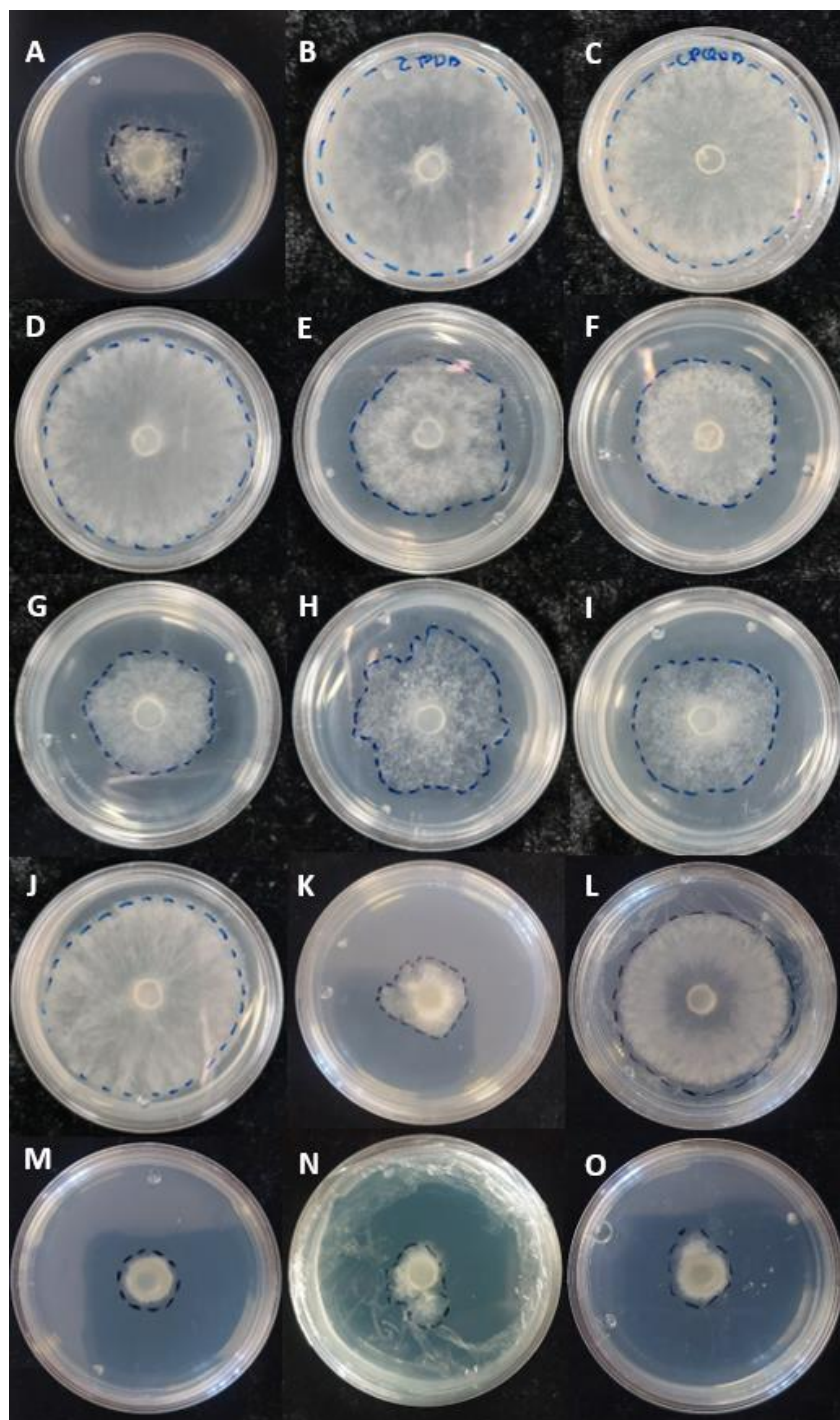


Figura 13. Inhibición del crecimiento de *L. gilaniensis* por nanopartículas de cobre medido a las 24 horas en medio PDA. **A)** Control sulfato de cobre 5 mM. **B)** *L. gilaniensis* CHC3-3 en PDA. **C)** *L. gilaniensis* CHC3-3 con quitina al 0.3%. **D)** Sobrenadante (S2) de *T. asperellum* EF09 con quitina al 0.3%. **E)** Sobrenadante (S2) de *T. asperellum* T15. **F)** Sobrenadante (S2) de *T. asperellum* T15 con quitina al 0.3%. **G)** Nanopartículas del sobrenadante (S2) de *T. asperellum* EF09 con quitina al 0.3%. **H)** Nanopartículas del sobrenadante (S2) de *T. asperellum* T15. **I)** Nanopartículas del sobrenadante (S2) de *T. asperellum* T15 con quitina al 0.3%. **J)** Sobrenadante (S1) de *T. asperellum* EF09 con quitina al 0.3%. **K)** Sobrenadante (S1) de *T. asperellum* T15. **L)** Sobrenadante (S1) de *T. asperellum* T15 con quitina al 0.3%. **M)** Nanopartículas del sobrenadante (S1) de *T. asperellum* EF09 con quitina al 0.3%. **N)** Nanopartículas del sobrenadante (S1) de *T. asperellum* T15. **O)** Nanopartículas del sobrenadante (S1) de *T. asperellum* T15 con quitina al 0.3%.

Transcurridas las 24 horas de incubación de los tratamientos, los controles de PDA y PDA+Q habían llenado la caja. El $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ logró inhibir el crecimiento del hongo tal y como había ocurrido anteriormente. En cuanto a los tratamientos con S2, los tratamientos S2 – PQT15 y S2 – PT15 tuvieron crecimiento promedio muy similar y en menor medida que el tratamiento S2 – PQ09. En cuanto a los tratamientos de S1, todos los tratamientos tuvieron menor crecimiento del hongo en comparación con los controles de PDA y PDA+Q. Sólo el tratamiento con S1 – PT15 logró una inhibición similar al $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

En cuanto a las NP, hubo diferencia de inhibición evidente en todos los tratamientos de S2 – NP con respecto a los S1 NP, donde estos últimos tuvieron inhibición de crecimiento similar al de CuSO_4 .

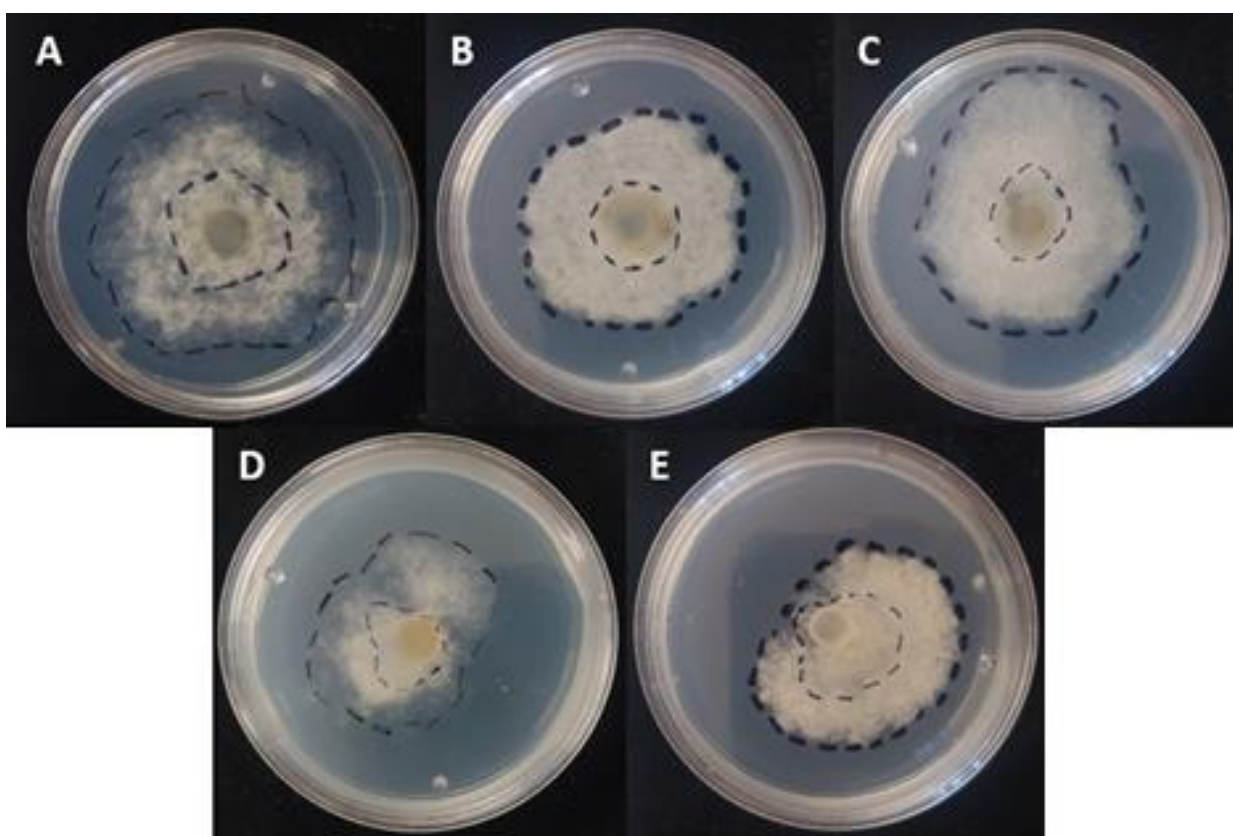


Figura 14. Inhibición del crecimiento de *L. gilaniensis* por nanopartículas de cobre medido a las 48 horas en medio PDA. **A)** Control CuSO_4 . **B)** Nanopartículas del sobrenadante (S1) de *T. asperellum* EF09 con quitina al 0.3%. **C)** Nanopartículas del sobrenadante (S1) de *T. asperellum* T15 con quitina al 0.3%. **D)** Nanopartículas del sobrenadante (S1) de *T. asperellum* T15. **E)** Sobrenadante (S1) de *T. asperellum* T15.

Tras 48 horas, solo los tratamientos con el S1 mantuvieron inhibición de crecimiento del hongo. En particular, los tratamientos de S1 – NP mostraron inhibición similar a la del CuSO_4 , y el S1 – PT15 mantuvo una buena inhibición del hongo (Figura 14).

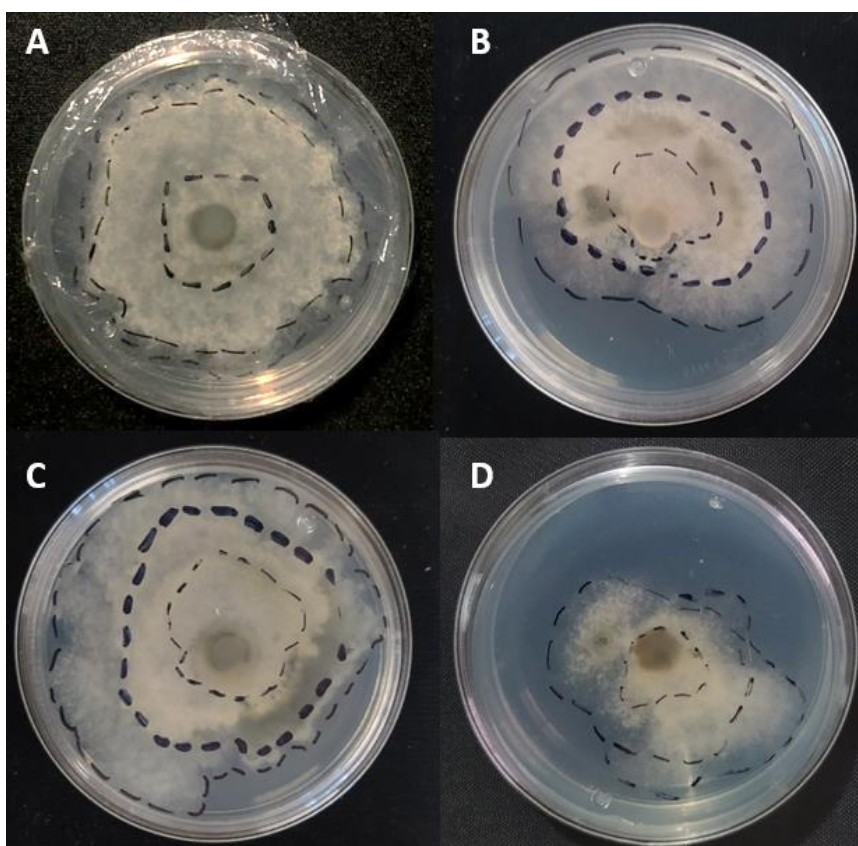


Figura 15. Inhibición del crecimiento de *L. gilaniensis* por nanopartículas de cobre medido a las 72 horas en medio PDA. **A)** Control CuSO_4 . **B)** Sobrenadante (S1) de *T. asperellum* T15. **C)** Nanopartículas del sobrenadante (S1) de *T. asperellum* EF09 con quitina al 0.3%. **D)** Nanopartículas del sobrenadante (S1) de *T. asperellum* T15.

Tras 72 horas, el tratamiento S1 – NP PQ09 y el S1 – PT15 mantuvieron una buena inhibición, la cual fue mejor en el tratamiento de nanopartículas (Figura 15).

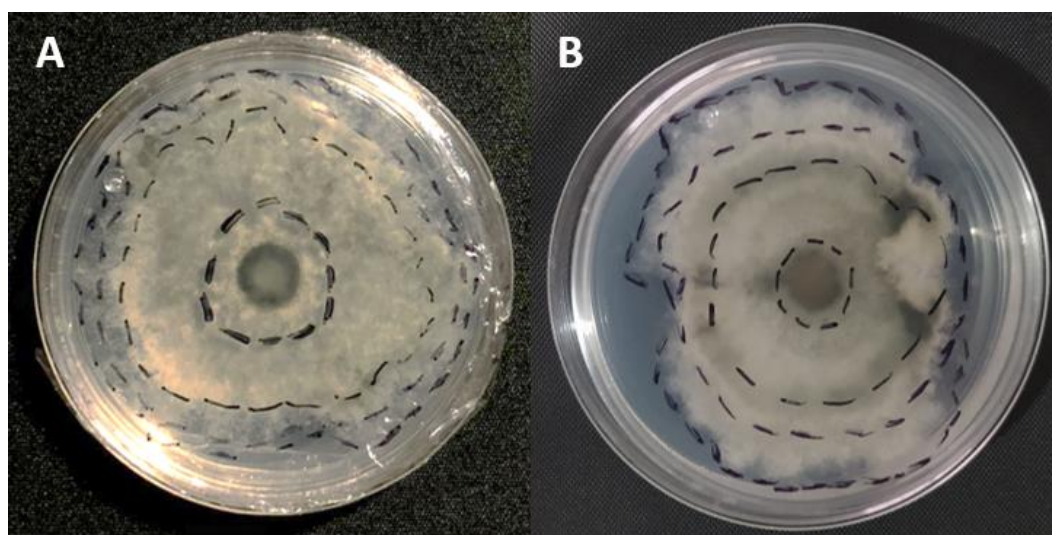


Figura 16. Inhibición del crecimiento de *L. gilaniensis* por nanopartículas de cobre medido a las 96 horas en medio PDA. **A)** Control $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. **B)** Nanopartículas del sobrenadante (S1) de *T. asperellum* EF09 con quitina al 0.3%.

Tabla 5. Crecimiento (media \pm desviación estándar, N=3), del hongo *Lasiodiplodia gilaniensis* CHCS3-3 con los diferentes tratamientos, monitoreados cada 24 horas.

Tratamientos	Área (mm ²)			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
PDA	2078 \pm 27	-	-	-
PDAQ	1811 \pm 51	-	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	269 \pm 45	1212 \pm 111	1481 \pm 87	2077 \pm 188
S1 – NP PQ09	200 \pm 91	960 \pm 102	1460 \pm 61	1491 \pm 43
S1 – NP PQT15	156 \pm 26	1014 \pm 129	-	-
S1 – NP PT15	153 \pm 12	1259 \pm 535	1651 \pm 614	-
S2 – NP PQ09	830 \pm 74	-	-	-
S2 – NP PQT15	826 \pm 59	-	-	-
S2 – NP PT15	1090 \pm 212	-	-	-
S2 – PQ09	1748 \pm 159	-	-	-
S2 – PQT15	1076 \pm 277	-	-	-
S2 – PT15	1100 \pm 117	-	-	-
S1 – PQ09	1622 \pm 146	-	-	-
S1 – PQT15	1381 \pm 108	-	-	-
S1 – PT15	262 \pm 38	740 \pm 59	1634 \pm 159	-

(-) Indica que el hongo llenó la caja.

En la última medición realizada tras 96 horas, solo el control con CuSO₄·5H₂O y el tratamiento S1 – NP PQ09 fueron los únicos en los que en sus tres réplicas en donde el hongo no llenó por completo la placa. El tratamiento con nanopartículas detuvo casi en su totalidad el avance del hongo patógeno a las 72 horas, en comparación con el sulfato de cobre el cual sí aumentó su diámetro con respecto a su anterior medición (Figura 16 y Tabla 5).

3.7 Caracterización y estabilidad de las CuONPs

Las nanopartículas biosintetizadas por *T. asperellum* EF09 se caracterizaron fisicoquímicamente. Tras obtener la medida del potencial zeta de las nanopartículas, se observó un único pico con distribución

negativa de -28.5 mV. Esto indica que la suspensión de nanopartículas tiene una carga negativa que permite que haya repulsión entre las nanopartículas y evita aglomeración (Figura 17

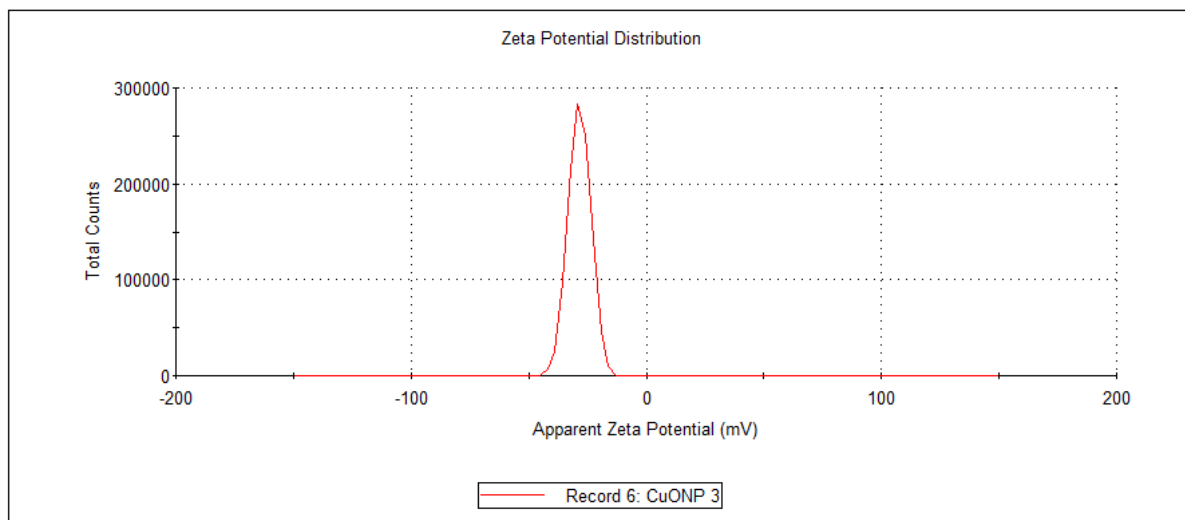


Figura 17. Distribución del potencial zeta de las CuONP EF09. La distribución se encuentra del lado negativo con un valor de -28.5 mV. El eje Y representa el recuento total de partículas en la muestra, mientras que el eje X el potencial zeta (mV).

El UV – Vis se realizó de los 250 nm a 600 nm. El espectro muestra un pico a los 320 nm, correspondiente al óxido de cobre (CuO) de las nanopartículas (Figura 18).

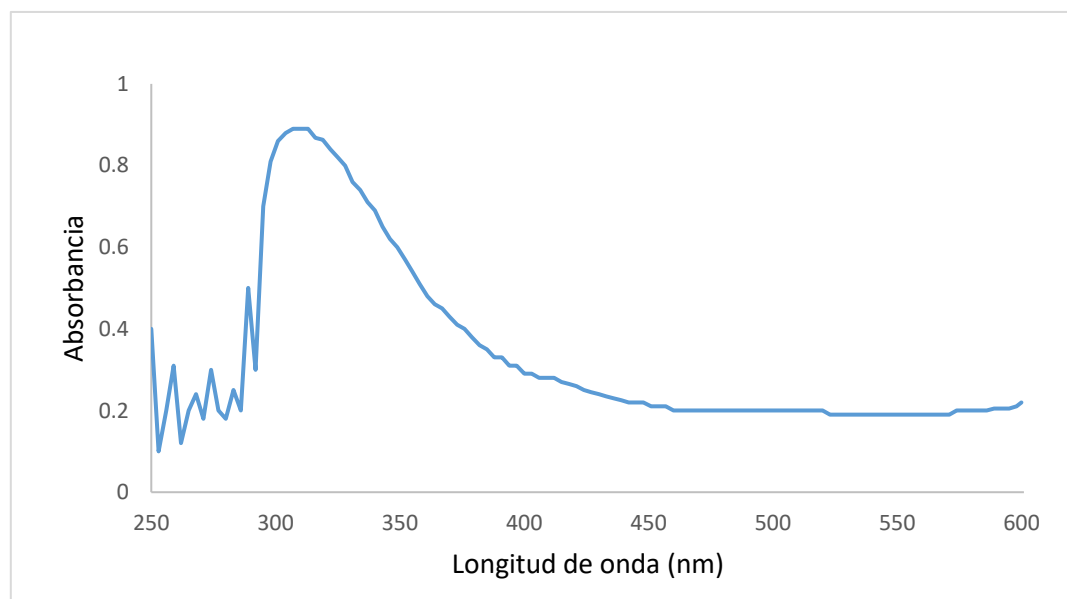


Figura 18. Espectro de UV-Vis de las CuONPs EF09. El pico se encuentra en los 320 nm.

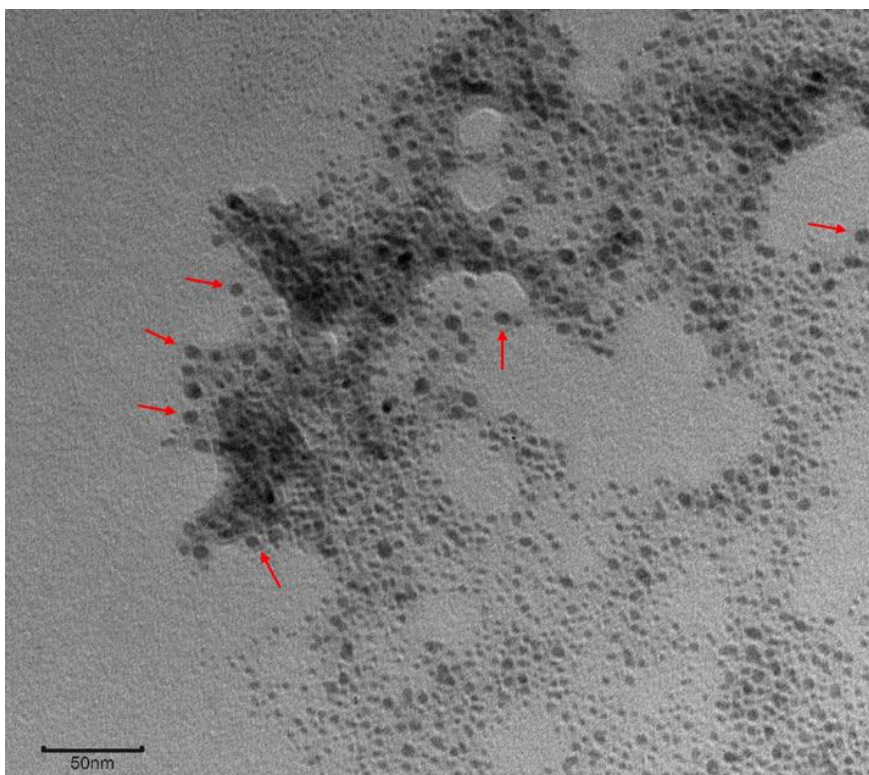


Figura 19. Imagen obtenida a través de microscopía electrónica de transmisión. Se muestra la morfología y el tamaño de las CuONPs EF09. Las flechas rojas señalan algunas de las nanopartículas con forma cuasi-esférica presentes en la muestra.

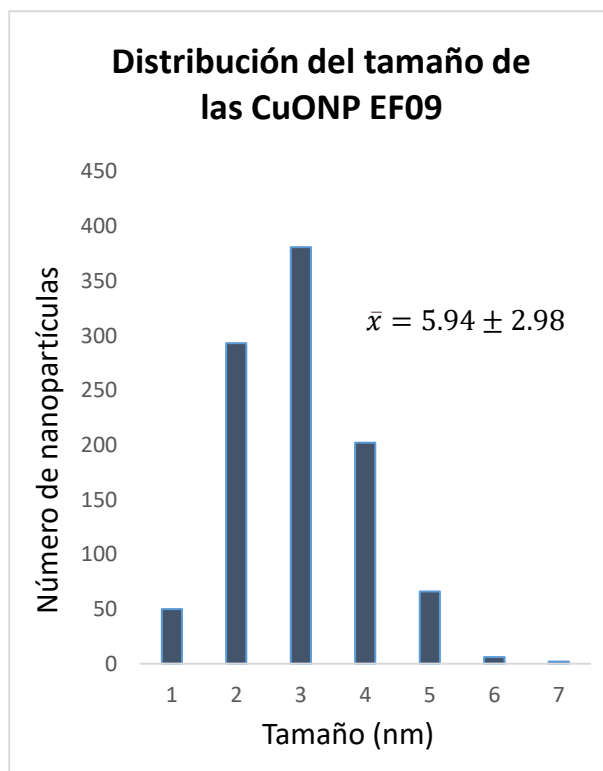


Figura 20. Distribución del tamaño de las CuONPs EF09. El tamaño promedio fue de 5.94 nm con una desviación estándar de ± 2.98 . Este valor se obtuvo después de la medición de 1.000 nanopartículas.

La imagen de TEM permitió determinar el tamaño de las nanopartículas y su morfología. El tamaño promedio fue de 5.94 nm, con morfología cuasi-esférica (Figuras 19 y 20). También, se pudo observar que las nanopartículas se encuentran embebidas en una matriz de material biológico derivado del sobrenadante de la *T. harzianum* EF09. Las nanopartículas que se encuentran en un mayor cúmulo de esta matriz tuvieron un tamaño mayor a las que no lo están. Esto puede indicar que, en esa zona, las nanopartículas tienen mayores componentes biológicos acoplados a su estructura, formando la corona proteica (Figura 19)

3.8 Actividad antifúngica de las CuONPs en plantas de vid cv. Cabernet

Sauvignon

Transcurridos los dos meses, las plantas fueron cortadas para medir la lesión generada por el hongo *L. brasiliensis* con los tratamientos utilizados para este experimento. Las plantas que fueron inoculadas con agua no presentaron daño evidente más que el generado por la misma lesión, en general presentaban tejido verde en todo el xilema y la coloración de la médula era café intensa, como en una planta sana. Las plantas inoculadas con *L. brasiliensis* MXBCL28, presentaron lesiones de hasta 6.6 cm de longitud, alrededor de la zona de inoculación. Como características que aparecen debido al daño por el hongo, el xilema se torna necrótico, oscuro y más seco.

El tratamiento inoculado con nanopartículas sin el patógeno presentaba tejido verde, sin lesión y las plantas eran visiblemente más sanas. Sobre la herida generada por el taladro, incluso se pudo observar tejido verde regenerado. Esto es algo positivo debido a que indica que no hay daño aparente de las nanopartículas en la planta (Figura 21).

El tratamiento que fue inoculado con las nanopartículas y el patógeno, presentó lesión promedio de 4.1 cm. En el tratamiento con el sulfato de cobre no se observó tejido verde alrededor de la lesión, pero en los extremos de la planta. Las plantas tratadas con sulfato de cobre con el patógeno presentaron una lesión promedio de 3.9 cm alrededor de la herida. Además, no se vio tejido verde alrededor de la lesión o hacia los extremos del tronco de la planta, pero sí lesión necrótica alrededor de la herida.

Los resultados de las plantas tratadas con sobrenadante y esporas de la *Trichoderma* tuvieron características similares de longitud y aspecto de la lesión, con una longitud de lesión promedio de 5.04 cm alrededor de la herida. Además, los troncos de la vid se notaban más secos debido a los efectos del hongo *L. brasiliensis* MXBCL8 (Figura 21)

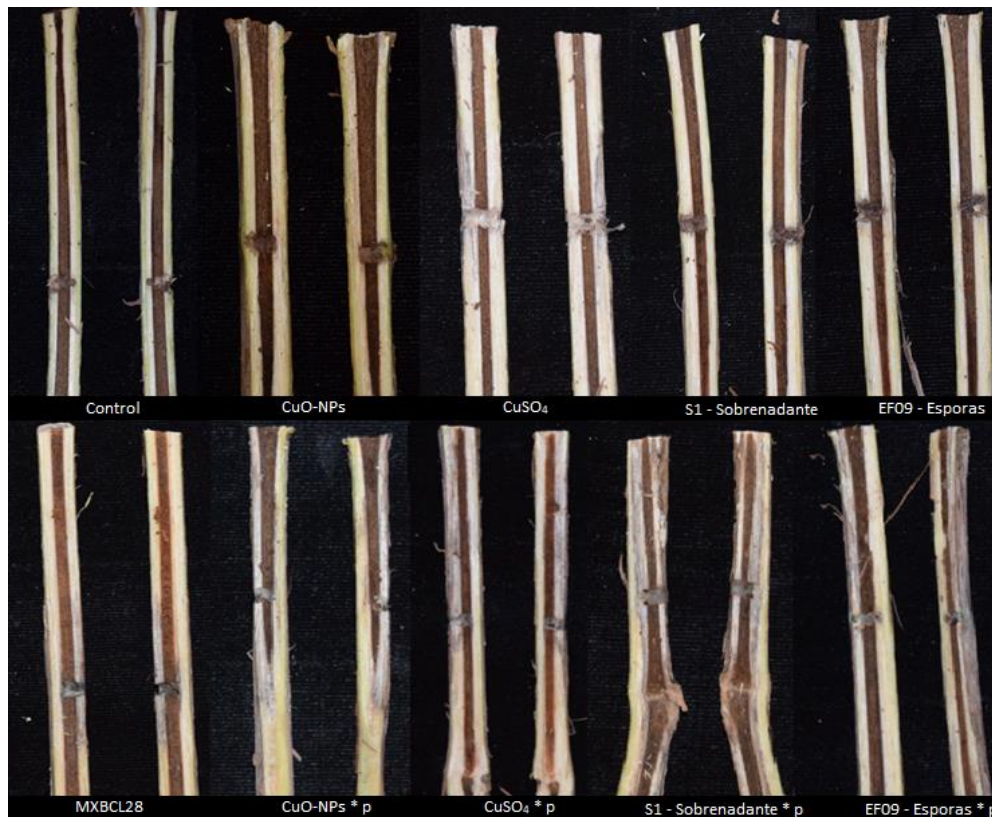


Figura 21. Lesiones generadas después de 2 meses de tratamiento en plantas de vid. p: indica tratamientos inoculados con *Lasiodiplodia brasiliensis* MXBCL28.

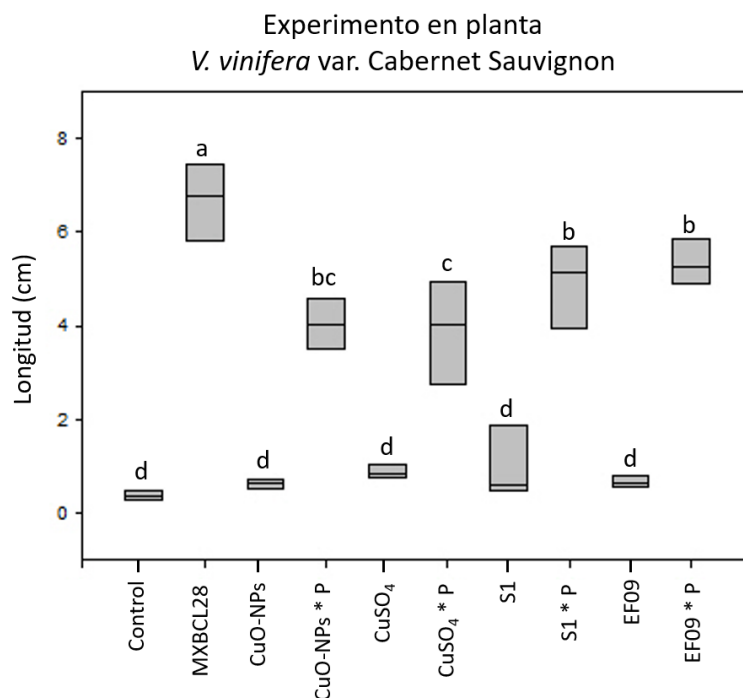


Figura 22. Longitud de lesión causada por *Lasiodiplodia brasiliensis* MXBCL28 en plantas de vid 2 meses después de la inoculación bajo condiciones de invernadero. Las barras indican la desviación estándar en cada tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey (diferentes letras indican significancia estadística en $P < 0.05$).

Capítulo 4. Discusión

En el presente estudio, se biosintetizaron nanopartículas de óxido de cobre a partir de cepas de *Trichoderma* y se evaluó su efecto contra dos especies de *Lasiodiplodia*. Para llevar a cabo la biosíntesis de las nanopartículas se usaron sobrenadantes de *Trichoderma asperellum* obtenidos a los nueve días de incubación. Este trabajo es el primero en el que se evalúan nanopartículas de cobre en plantas de vid en condiciones de invernadero. Con base en la hipótesis del proyecto, los resultados sugieren que no hubo diferencias significativas con respecto a otros tratamientos utilizados para inhibir a *Lasiodiplodia brasiliensis* MXBCL28 y *Lasiodiplodia gilaniensis* CHCS3-3. Es importante destacar que al realizar una síntesis biológica de nanopartículas, el uso de metales tóxicos se reduce a comparación de otros métodos de síntesis donde se implica el uso de sustancias químicas tóxicas y solventes orgánicos (Guilger y Lima, 2020).

Para aumentar la producción de metabolitos en los sobrenadantes de *Trichoderma*, en algunos cultivos se utilizó quitina al 0.3% como suplemento y se evaluaron los sobrenadantes obtenidos en ensayos antifúngicos, comparándolos con los no suplementados. Se esperaba en los cultivos suplementados con quitina se promoviera la síntesis de enzimas degradadoras de pared celular y por consecuencia, tuvieran mayor actividad antifúngica. Sin embargo, en el ensayo antifúngico el sobrenadante PT15 (sin suplemento de quitina), fue el que mostró mayor inhibición en comparación al resto. Las especies de *Trichoderma* producen quitinasas, enzimas encargadas de degradar la pared celular de algunos hongos. Debido a esto, en algunos trabajos han utilizado quitina como inductor de estas enzimas. Por ejemplo, Baldoni y colaboradores (2020), evaluaron la producción de quitinasas por *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 usando distintas fuentes de quitina; encontrando que la quitina coloidal aumentó la producción de quitinasas, además de tener la mayor actividad enzimática; mientras que el uso de quitina proveniente de cáscara de camarón triturada tuvo el menor impacto en sus experimentos. Similarmente, Nampoothiri y colaboradores (2004), lograron inducir una alta concentración de quitinasa en *Trichoderma harzianum* usando quitina coloidal como inductor enzimático. Con base en los reportes anteriores, la fuente ideal para inducir la producción de quitinasas es la quitina coloidal. Dado que en este trabajo usamos quitina proveniente de camarón triturado para suplementar los cultivos, esto explica que no hubiera diferencias significativas entre los tratamientos con quitina y sin quitina. Una vez obtenido el sobrenadante, se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas con sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) como precursor en una relación 1:3, donde se utilizó 1mL de sobrenadante por cada 3mL de sulfato de cobre pentahidratado.

Para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas, el pH jugó un papel determinante en la síntesis y en la capacidad de inhibición de las nanopartículas, ya que puede influir en la formación, tamaño, forma y propiedades de las nanopartículas obtenidas. El control del pH durante la síntesis de nanopartículas también es esencial para obtener nanopartículas con las características deseadas y para garantizar que pueda ser una síntesis reproducible y controlada (Kareem et al., 2020). Para este trabajo, se eligió un pH de 11, siendo este el pH ideal en el que las nanopartículas mostraron mayor estabilidad.

A partir de cepas de *Trichoderma asperellum* aisladas en la región de Baja California, se obtuvo satisfactoriamente la biosíntesis de nanopartículas de óxido de cobre con dos distintas concentraciones (5mM y 10mM). La formación de nanopartículas metálicas se evidenció por el cambio de coloración tras modificar el pH de síntesis en la suspensión que contenía al sulfato de cobre y el sobrenadante de las cepas de *T. asperellum*. El cambio fue de amarillo a azul, que tras 24h en oscuridad y a temperatura ambiente llegó a un azul más intenso. En un estudio donde se utilizó *Trichoderma harzianum* para la biosíntesis de nanopartículas de plata, óxido de cobre y óxido de zinc, modificaron su pH de síntesis de 6 – 12 y encontraron diferencias en morfología y tamaño dependiendo qué tan alcalino era el pH de que se utilizaba (Consolo et al., 2020). En otro estudio donde se utilizaron especies de *Streptomyces* para la biosíntesis de nanopartículas de óxido de cobre para aplicaciones biotecnológicas, se reportó que usando pH 9 se obtenían nanopartículas esféricas y con tamaños promedio de 80nm (Hassan et al., 2019). Como puede observarse, cambios en el pH de síntesis, aunado al metal precursor que se utilice da como resultado diferencias en morfología y tamaño de las nanopartículas resultantes.

En cuanto a la caracterización fisicoquímica, el espectro de UV-Vis mostró un único pico de absorción correspondiente a las nanopartículas de CuO a los 320 nm. El pico de absorción puede variar dependiendo de factores como la temperatura, tipo de extracto y el metal precursor que se utilice (Weldegebríeal 2020), sin embargo, el espectro obtenido fue similar a los reportados en la literatura (Kayalvizhi et al., 2019; Mohamed et al., 2020). Otro punto importante en la caracterización de las nanopartículas fue el potencial Zeta, que tuvo un valor de -28.5mV.

Un potencial zeta ya sea positivo o negativo, provoca que exista repulsión entre las nanopartículas y evita su aglomeración (Kosmulski, 2004). Un valor negativo en síntesis biológica de nanopartículas se asocia a la presencia de grupos funcionales amino(-NH₂) y el grupo carboxilo (-COOH) (Pihlasalo et al., 2012), lo que indicaría la presencia de proteínas y enzimas en la corona proteica de la nanopartícula. Esto podría indicar que se logró el objetivo de sintetizar nanopartículas a partir de sobrenadantes de *Trichoderma*.

La caracterización por TEM reveló que las nanopartículas tuvieron forma cuasi-esférica, con un tamaño promedio de 5.94 nm. Según otros reportes de síntesis de CuO por método biológico, Thekkae y Černík (2013), biosintetizaron nanopartículas de CuO con forma esférica y de tamaños promedios de 4.8 ± 1.6 nm, 5.5 ± 2.5 nm, y 7.8 ± 2.3 nm usando *gum karaya*, un hidrocoloide natural no tóxico y probaron su efecto contra bacterias Gram-negativas. Por su parte, Gopinath y colaboradores (2016), a partir de extracto acuoso de fruto seco de *Tribulus terrestris*, sintetizaron nanopartículas de CuO, de forma esférica y alta estabilidad, con un rango en tamaño de 5-22 nm. Así, el tamaño de las nanopartículas sintetizadas en este trabajo es similar a los reportados en literatura, las diferencias en el tamaño y la forma de las nanopartículas puede deberse al método de síntesis empleado, al microorganismo usado para realizar la síntesis, el pH de formación de las nanopartículas, entre otras cosas (Huang et al., 2015).

El cobre es uno de los fungicidas más usados en vid, especialmente para controlar enfermedades foliares como el mildiú vellosa (Berkelmann-Löhnertz et al., 2012). Los productos a base de cobre (fungicidas cúpricos) tienen un amplio espectro de actividad; sin embargo, se pretende reducir su uso en la agricultura a un máximo de 28 kg/ha de cobre metálico en un plazo de siete años, o 4 kg/ha/año en la comunidad económica europea (1981/2018 EC regulation), debido a sus posibles efectos fitotóxicos y por el riesgo de acumulación en el suelo y el agua (Rusjan et al., 2007; Brunetto et al., 2014). Por ello, se debe investigar estrategias para disminuir el contenido de cobre de los pesticidas, como reducir el tamaño de sus partículas. Con el uso de nanopartículas se pretende disminuir el uso del cobre al desarrollar fungicidas verdes a base de cobre que pueden ayudar a combatir los problemas actuales de los fungicidas sintéticos.

Aunque las nanopartículas sintetizadas aquí mostraron efecto *in vitro* contra los hongos de la madera evaluados, el efecto no fue altamente significativo. Esto puede deberse en parte a que la cepa usada para los ensayos, *Lasiodiplodia brasiliensis* L28, ha probado ser altamente virulenta en vid (Rangel-Montoya et al., 2021). En un trabajo en donde se sintetizaron nanopartículas de óxido de cobre a partir de extracto de hoja de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), las nanopartículas tuvieron bioactividad significativa contra los hongos patógenos de manzana *Alternaria mali*, *Diplodia seriata* y *Botryosphaeria dothidea*, sin embargo, solo se probó su efecto *in vitro*, observándose una disminución del crecimiento de los hongos, lo que indica que el cobre no es lo suficientemente tóxico para estos patógenos. Por ello se sugiere probar otros metales para realizar la síntesis de las nanopartículas. En los tratamientos en planta que se aplicó las nanopartículas, no se vio un efecto negativo en la planta durante el tiempo que duraron los experimentos. Es importante evaluar con más ensayos y con distintas nanopartículas para poder definir si el aplicarlas como producto para inhibir patógenos, no causa un efecto negativo en las plantas, así como el entorno.

Por otro lado, el uso de nanopartículas en cultivos agrícolas es un tema cuestionado por los efectos secundarios que podrían tener y que no se han evaluado, por ejemplo, la toxicidad al ser metales, su bioacumulación en la planta y en el entorno donde se apliquen. Debido a esto, es importante evaluar sus efectos a largo plazo.

Capítulo 5. Conclusiones

Se llevó a cabo la síntesis exitosa de nanopartículas de óxido de cobre mediante el uso de tres cepas de *T. asperellum* (EF09, T11 y T15). Tras la evaluación de actividad antifúngica *in vitro* de los sobrenadantes de las diferentes cepas, se encontró que el sobrenadante (S1) de *T. asperellum* T15 mostró mejor actividad con respecto a los sobrenadantes de la EF09 y T11.

En los ensayos *in vitro*, se observó que las nanopartículas biosintetizadas con *T. asperellum* EF09, mostraron mayor inhibición del crecimiento de *Lasiodiplodia gilaniensis*. Posteriormente, estas nanopartículas se caracterizaron y se encontró que tenían un tamaño promedio de 6.78 nm con forma casi-esférica además de un potencial Z de -28.5mV, lo que indica su estabilidad.

En ensayos *in vitro*, se evaluó la capacidad de las nanopartículas para inhibir el crecimiento de *Lasiodiplodia brasiliensis* MXBCL28. Los resultados mostraron que las nanopartículas sí inhibieron el crecimiento del hongo en comparación con el control en placa. Por último, se evaluó el impacto de las nanopartículas en plantas de vid, y se encontró que no hubo inhibición del hongo *L. brasiliensis* MXBCL28, sin embargo, es importante destacar que las nanopartículas no afectaron negativamente a la planta.

Literatura citada

- Abdallah M. E., Abdullah N. Al-Rahmah, Shaban R. S., Abdurahman H., Ashraf Abdel-Fattah M. y Ali H. B. (2016). Antimicrobial activity and green synthesis of silver nanoparticles using *Trichoderma viride*, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30:2, 299-304.
- Abdel-Kareem, M. M., y Zohri, A. A. (2018). Extracellular mycosynthesis of gold nanoparticles using *Trichoderma hamatum* : optimization, characterization and antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*. doi:10.1111/lam.13055.
- Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., García-Jiménez, J. y Armengol, J. (2013). Detection of black-foot and Petri disease pathogens in soils of grapevine nurseries and vineyards using bait plants. *Plant and Soil*, 364(1-2), 5–13.
- Ahmad, H., Venugopal, K., Bhat, A. H., Kavitha, K., Ramanan, A., Rajagopal, K., Srinivasan, R. y Manikandan, E. (2020). Enhanced Biosynthesis Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles (CuONPs) for their Antifungal Activity Toxicity against Major Phyto-Pathogens of Apple Orchards. *Pharmaceutical Research*, 37(12), 246.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L. y Ikram, S. (2016). A review on plants extracts mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of advanced research*, 7: 17-28.
- Anyaogu, K. C., Fedorov, A. V. y Neckers, D. C. (2008). Synthesis, characterization, and antifouling potential of functionalized copper nanoparticles. *Langmuir* 24:4340–4346.
- Baldoni, D. B., Antonioli, Z. I., Mazutti, M. A., Jacques, R. J. S., Dotto, A. C., de Oliveira Silveira, A., ... de Souza, A. R. C. (2020). Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 using solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. Recuperado en 2022, de doi:10.1007/s42770-020-00334-w.
- Berkelmann-Löhnertz, B., Klärner S., Baus, O., Herrmann, G., Flemming, B., Keicher, R., Schwarz, H., Pflieginger, M. y Löhnertz, O. (2012). Kupferreduzierung und kupfersubstitution im weinbau – zumstand der dinge aus sicht der forschung. *Reports From the Julius Kühn-Institut – Plant Protection in Organic Farming – 11th Workshop in Berlin, Germany, Vol. 164*, 65–70.
- Bruez E., Anatole-Mounier L., Vallance J., Bussière S., Denaix L., Rey P. y Thiéry D. (2017). High concentration of copper in vineyard soil favours the development of wood necrosis caused by the *Botryosphaeria dieback* pathogen *Neofusicoccum parvum*. 10th IWGTD, Reims, 4-7 juillet 2017 in *Phytopathologia Mediterranea* 56 (3) 513-588. Recuperado en 2022, de doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-21865.
- Brunetto, G., Miotto, A., Ceretta, C. A., Schmitt, D. E., Heinzen, J., de Moraes, M. P., Canton, L., Tiecher, T. L., Comin, J. J. y Giroto E. (2014). Mobility of copper and zinc fractions in fungicide-amended vineyard sandy soils. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(5), 609–624. Recuperado en 2022, de doi:10.1080/03650340.2013.826348.
- Carlucci, A., Cibelli, F., Lops, F. y Raimondo, M. L. (2015). Characterization of *Botryosphaeriaceae* species as causal agents of trunk diseases on grapevines. *Plant Dis.* 99:1678-1688. Recuperado en 2021, de <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0286-RE>.

- Castillo-Pando, M., Somers, A., Green, C. D., Priest, M. y Skriskanthade, M. (2001). Fungi associated with dieback of Semillon grapevines in the Hunter Valley of New South Wales. *Australasian Plant Pathology* 30, 59-63.
- Cioffi N., Torsi L., Ditaranto N., Tantillo G., Ghibelli L., Sabbatini L. (2005). Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chem Mater* 17:5255–5262.
- Consolo, V. F., Torres-Nicolini, A., y Alvarez, V. A. (2020). Mycosynthetized Ag, CuO and ZnO nanoparticles from a promising *Trichoderma harzianum* strain and their antifungal potential against important phytopathogens. *Scientific Reports*, 10(1).
- Diorio, L.A., F. Forchiassin, V.L. Papinutti, y D.V. Sueldo. (2003). Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina). *Revista Iberoamericana de Micología* 20:11-15.
- Djonovic, S., W.A. Vargas, M.V. Kolomiets, M. Horndeski, A. Wiest y C.M. Kenerley. (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiology* 145:875-889.
- Elamawi, R.M., Al-Harbi, R.E., y Hendi, A. A. (2018). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egypt J Biol Pest Control* 28, 28.
- Farias, Charles B.B., Silva, Aline Ferreira, Rufino, Raquel Diniz, Luna, Juliana Moura, Souza, José Edson Gomes, Sarubbo, Leonie Asfora. (2014). Synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant produced in low-cost medium as stabilizing agent. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(3), 122–125.
- Florence Fontaine, David Gramaje, Josep Armengol, Richard Smart, Zora Annamaria Nagy, et al. (2016). Grapevine trunk diseases. A review. OIV Publications, 24 p., 979-10-91799-60-7. (hal-01604038).
- Fujimori, Y., Sato, T., Hayata, T., Nagao, T., Nakayama, M., Nakayama, T., Sugamata, R. y Suzuki, K. (2012). Novel antiviral characteristics of nanosized copper (I) iodide particles showing inactivation activity against 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *Appl Env Microbiol* 78(4):951–955.
- González Andrade, Salvador. (2015). Cadena de valor económico del vino de Baja California, México. *Estudios fronterizos*, 16(32), 163-193. Recuperado el 03 de noviembre del 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-69612015000200006&lng=es&tlng=es.
- Gopinath, V., Priyadarshini, S., Al-Maleki, A. R., Alagiri, M., Yahya, R., Saravanan, S. y Vadivelu, J. (2016). In vitro toxicity, apoptosis and antimicrobial effects of phyto-mediated copper oxide nanoparticles. *RSC Advances*, 6(112), 110986–110995. Recuperado en 2022, de doi:10.1039/c6ra13871c.
- Guilger-Casagrande, M., Germano-Costa, T., Pasquoto-Stigliani, T. et al. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Sci Rep* 9, 14351.
- Guilger-Casagrande, M., y Lima, R. de. (2019). Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7.

- Harman, G. E., Howell, C. R. y Viterbo, A. (2004). *Trichoderma* species- opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:43-56.
- Hohmann, P., E.E. Jones, R.A. Hill y A. Stewart. (2011). Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonisation and growth promotion for commercially seedlings. *Fungal Biology United Kingdom* 115:759-767.
- Huang, L., Luo, F., Chen, Z., Megharaj, M. y Naidu, R. (2015). Green synthesized conditions impacting on the reactivity of Fe NPs for the degradation of malachite green. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 137, 154–159. Recuperado el 14 de febrero del 2023, de doi:10.1016/j.saa.2014.08.116.
- Idris, A.S.O., A. Pandey, S. Rao y R.K. Sukumaran. (2017). Cellulase production through solid state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. *Bioresource Technology* 242:265271.
- Ingle, A. P., Duran, N. y Rai, M. (2014). Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1001–1009.
- Kareem, S., Adeleye, T., y Ojo, R. (2020). Effects of pH, temperature and agitation on the biosynthesis of iron nanoparticles produced by *Trichoderma* species. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 805, 012036.
- Kayalvizhi, S., Sengottaiyan, A., Selvankumar, T., Senthilkumar, B., Sudhakar, C., y Selvam, K. (2019). Eco-friendly cost-effective approach for synthesis of copper oxide nanoparticles for enhanced photocatalytic performance. *Optik*, 163507. Recuperado el 10 de noviembre del 2022, de doi:10.1016/j.ijleo.2019.163507.
- Kosmulski, M. (2004). pH-dependent surface charging and points of zero charge II. Update. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 214–224. Recuperado el 10 de noviembre del 2022, de doi:10.1016/j.jcis.2004.02.029.
- Li, X., Xu, H., Chen, Z. y Chen, G. (2011). Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications. 2011(0), 1–16.
- Lúquez Bibiloni, Claudia. V., y Formento, J. C. (2002). Flor y fruto de vid [*Vitis vinifera* L.]: Micrografía aplicada a viticultura y enología.
- Mali, S. C., Dhaka, A., Githala, C. K. y Trivedi, R. (2020). Green synthesis of copper nanoparticles using *Celastrus paniculatus* Willd. leaf extract and their photocatalytic and antifungal properties, *Biotechnology Reports*. 27, e00518.
- Martelli, Giovanni P. (2001). *Encyclopedia of Life Sciences || Virus Diseases of Grapevine*. doi:10.1038/npg.els.0000766.
- Maqsood, S., Qadir, S., Hussain, A., Asghar, A., Saleem, R., Zaheer, S., y Nayyar, N. (2020). Antifungal Properties of Copper Nanoparticles against *Aspergillus niger*. *Scholars International Journal of Biochemistry*, 3(4), 87-91.
- Mohamed, A. A., Abu-Elghait, M., Ahmed, N. E. y Salem, S. S. (2020). Eco-friendly Mycogenic Synthesis of ZnO and CuO Nanoparticles for In Vitro Antibacterial, Antibiofilm, and Antifungal Applications.

- Biological Trace Element Research. Recuperado el 10 de noviembre del 2022, de doi:10.1007/s12011-020-02369-4.
- Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., ... Fontaine, F. (2018). Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant disease* 102: 1189–1217. Recuperado en 2022, de doi:10.1094/PDIS-08-17-1181-FE.
- Muhammad I. D. y Rida R. (2017). Synthesis, Characterization, and Applications of Copper Nanoparticles, *Analytical Letters*, 50:1, 50-62.
- Nampoothiri, K. M., Baiju, T., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G. y Pandey, A. (2004). Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, 39(11), 1583–1590. Recuperado en 2022, de doi:10.1016/s0032-9592(03)00282-6.
- Pandya, J. R., Sabalpara, A. N. y Chawda, S. K. (2011). *Trichoderma*: A particular weapon for biological control of phytopathogens. *J. Agric. Technol.* 7:1187-1191.
- Panorama agroalimentario. (2021). Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Recuperado el 15 de octubre del 2022, de <https://www.gob.mx/siap/documentos/panorama-agroalimentario-2021>
- Pihlasalo, S., Auranen, L., Hänninen, P. y Härmä, H. (2012). Method for Estimation of Protein Isoelectric Point. *Analytical Chemistry*, 84(19), 8253–8258. Recuperado en 2022, de doi:10.1021/ac301569b.
- Ponnusamy P., Kolandasamy M., Viswanathan E., y Balasubramanian M. G. (2016). Antifungal activity of biosynthesised copper nanoparticles evaluated against red root-rot disease in tea plants, *Journal of Experimental Nanoscience*, 11:13, 1019-1031.
- Prabhu, S. y Poulouse, E.K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett* 2, 32. <https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32>.
- Ramirez, L. S., y Marin C. D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*, XV (42),263-268.
- Rusjan, D., Strlič, M., Pucko, D. y Korošec-Koruza, Z. (2007). Copper accumulation regarding the soil characteristics in Sub-Mediterranean vineyards of Slovenia. *Geoderma*, 141(1-2), 111–118. Recuperado en 2022, de doi:10.1016/j.geoderma.2007.05.007.
- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M. K., Sharma, S. S., Pal, A. y Biswas, P. (2015). *International Journal of Biological Macromolecules*, 75:346-353.
- Salem, S.S., Fouda, A. (2021). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: an Overview. *Biol Trace Elem Res* 199, 344–370. Recuperado en 2022, de <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02138-3>.
- Savithamma, N., Rao, M. L., Rukmini, K. y Devi, P. S. (2011). Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using medicinal plants. *International Journal of ChemTech Research*, 3(3), 13941402.
- Serrano, L., Galindo, E. (2019). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. Academia Mexicana de Ciencia. Recuperado el 2022, de: <https://www.amc.edu.mx/>.

- Szegedi, E., y Civerolo, E. L. (2011). Bacterial diseases of grapevine. *International Journal of Horticultural Science*, 17(3), 45–49.
- Thekkae Padil, V. V. y Černík, M. (2013). Green synthesis of copper oxide nanoparticles using gum karaya as a biotemplate and their antibacterial application. *International journal of nanomedicine*, 8, 889–898. Recuperado el 2022, de <https://doi.org/10.2147/IJN.S40599>.
- Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., et al. (2021). Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), 1112. MDPI AG. Recuperado en 2022, de: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph18031112>.
- Usman M. S., El Zowalaty M. E., Shameli K., Zainuddin N. y Salama M., Ibrahim N. A. (2013). Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* 8:4467–4479.
- Úrbez-Torres J. R., E. Tomaselli, J. Pollard-Flamand, J. Boulé, D. Gerin y S. Pollastro. (2020). Characterization of *Trichoderma* isolates from southern Italy, and their potential biocontrol activity against grapevine trunk disease fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 59(3): 425-439.
- Úrbez-Torres, J. R., Haag, P., Bowen, P., y O’Gorman, D. T. (2014). Grapevine Trunk Diseases in British Columbia: Incidence and Characterization of the Fungal Pathogens Associated with Black Foot Disease of Grapevine. *Plant Disease*, 98(4), 456–468. Recuperado en 2022, de doi:10.1094/pdis-05-13-0524-re.
- Van Nierker, J. M., Crous, P. W., Fourie, P. H., Groenewald, J. Z. y Halleen, F. (2002). *Botryosphaeria* canker and dieback of grapevines. *Wynboer: A Technical Guide for Wine Producers*.
- Varshney, R., Bhadauria, S. y Gaur, M. S. (2012). A Review: Biological Synthesis Of Silver And Copper Nanoparticles. *Nano Biomedicine and Engineering*, 4(2).
- Waghunde, R. R., Shelake, R. M. y Sabalpara, A. N. (2016). *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African journal of agricultural research*, 11(22), 1952-1965.
- Waris, A., Din, M., Ali, A., Ali, M., Afridi, S., Baset, A. y Ullah Khan, A. (2020). A Comprehensive Review of Green Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles and Their Diverse Biomedical Applications. *Inorganic Chemistry Communications*, 108369. Recuperado en 2022, de doi:10.1016/j.inoche.2020.108369.
- Weldegebrerial, G. K. (2020). Photocatalytic and antibacterial activity of CuO nanoparticles biosynthesized using *Verbascum thapsus* leaves extract. *Optik*, 204, 164230. Recuperado en 2022, de doi:10.1016/j.ijleo.2020.164230.
- Yao, W., Qu, M., Cui, X., Xia, R., y Liu, X. (2020). Optimization of synthesizing silver nanoparticles from *Trichoderma* strains for inhibition of *Fusarium oxysporum*. *Sheng wu gong cheng xue bao. Chinese journal of biotechnology*, 36 9, 1859-1868 .