

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 CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

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 de Autor.

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



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de
cobre y su actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea***

Tesis

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

Presenta:

Erisneida del Rosario Campos Jiménez

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Erisneida del Rosario Campos Jiménez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Directora de tesis

Dr. Domingo Martínez Soto

Dr. Roberto Cruz Flores



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

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Erisneida del Rosario Campos Jiménez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ciencias de la Vida.

Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de cobre y su actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*

Resumen aprobado por:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Directora de tesis

Botrytis cinerea es un hongo patógeno vegetal necrotrófico que causa la enfermedad del moho gris y afecta a una amplia variedad de cultivos de importancia agrícola. La aplicación de fungicidas ha sido el principal método de control de la enfermedad, sin embargo, su eficacia se ha visto comprometida por la aparición de poblaciones de hongos que presentan resistencia a uno o varios fungicidas. Ante la búsqueda de nuevas estrategias de control, las nanopartículas se han presentado como una alternativa para lograr el manejo de la enfermedad. Entre ellas, las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs), las cuales pueden ser obtenidas por métodos físicos, químicos y biológicos. Los últimos, son considerados métodos de síntesis verde cuyo principal propósito es disminuir la generación de residuos que sean tóxicos para el medio ambiente. Este estudio, tuvo como objetivo obtener CuONPs biosintetizadas con el sobrenadante del hongo *Trichoderma* spp. y determinar sus propiedades antifúngicas contra *B. cinerea*. Se evaluaron los sobrenadantes de cuatro cepas: *T. asperellum* T8A, *T. harzianum* C4A, *T. ghanense* C4B y *T. atroviridae*. De las cuales, se destacaron por su alto porcentaje de inhibición *T. ghanense* C4B (73.61%) y *T. asperellum* T8A (41.66%), por ello fueron seleccionadas para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas. Se obtuvieron cuatro formulaciones distintas: TAP15, TAD15, TGP15 y TGD15. La formulación más efectiva resultó ser TGD15 que exhibió una CMI de 170 µg/mL, destacando su potencial en el control del fitopatógeno. Además, TGD15 demostró una eficacia superior en comparación al fungicida comercial Nordox 75W, ya que este último no logró inhibir el crecimiento micelial a las mismas concentraciones ni siquiera a concentraciones más altas. Este estudio destaca la viabilidad de las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) biosintetizadas con especies del género *Trichoderma* como una estrategia prometedora para el control del moho gris.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*, *Trichoderma*, Nanopartículas, Inhibición, Antifúngico

Abstract of the thesis presented by **Erisneida del Rosario Campos Jiménez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Science of Life.

Biosynthesis and characterization of copper oxide nanoparticles and their antifungal activity against *Botrytis cinerea*

Abstract approved by:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Thesis Director

Botrytis cinerea is a necrotrophic plant pathogenic fungus that causes gray mold disease and affects a wide variety of agriculturally important crops. The application of fungicides has been the primary method of disease control; however, their effectiveness has been compromised by the emergence of fungal populations resistant to one or more fungicides. In the quest for new control strategies, nanoparticles have emerged as a promising alternative for disease treatment. Among them, copper oxide nanoparticles (CuONPs) can be obtained through physical, chemical, and biological methods. The latter are considered a green synthesis methods, aimed at reducing the generation of environmentally toxic waste. This study aimed to obtain CuONPs biosynthesized with the supernatant of the fungus *Trichoderma* spp. and to determine their antifungal properties against *B. cinerea*. The supernatants of four strains were evaluated: *T. asperellum* T8A, *T. harzianum* C4A, *T. ghanense* C4B, and *T. atroviridae*. Among them, *T. ghanense* C4B (73.61%) and *T. asperellum* T8A (41.66%) stood out for their high inhibition percentage and were therefore selected for nanoparticles synthesis. Four different formulations were obtained: TAP15, TAD15, TGP15, and TGD15. The most effective formulation was TGD15, which exhibited a minimum inhibitory concentration (MIC) of 170 µg/mL, indicating its potential in controlling the phytopathogen. Furthermore, TGD15 demonstrated superior efficacy compared to the commercial fungicide Nordox 75W, as the latter did not inhibit mycelial growth at the same concentrations or even at higher concentrations. This study underscores the feasibility of copper oxide nanoparticles (CuONPs) biosynthesized with species of the genus *Trichoderma* as a promising strategy for the control of gray mold.

Keywords: *Botrytis cinerea*, *Trichoderma*, Nanoparticles, Inhibition, Antifungal.

Dedicatoria

A mis padres, Juana y Sidney,

por forjar con sus manos las alas que hoy me permiten volar

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, por permitirme continuar con mi formación académica en sus instalaciones. Al programa de Maestría en Ciencias de la Vida y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca de manutención que se me otorgó para realizar mis estudios de maestría.

A la Dra. Ernestina Castro Longoria, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, así como por compartir sus conocimientos conmigo e instruirme para crecer profesionalmente. Le agradezco por estar presente en todo el proceso y ayudarme a resolver las dudas que se presentaron en el camino.

Al Dr. Domingo Martínez Soto, por el apoyo brindado en mi trabajo de tesis, así como sus acertadas sugerencias que me permitieron mejorar continuamente. Gracias por siempre estar dispuesto a escuchar mis dudas y ayudarme a resolverlas.

Al Dr. Roberto Cruz Flores, por su apoyo en la elaboración de mi tesis, por sus comentarios y sugerencias, que fueron de gran aporte para la mejora de mi trabajo.

Al Dr. Alejandro Cabello Pasini, por el apoyo brindado para la obtención de material biológico empleado en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Olga Alicia Callejas Negrete, por instruirme en el uso de equipos y seguimiento de protocolos de laboratorio.

Al PhD. Daniel Rivera Mendoza, por su apoyo en el laboratorio durante el proceso experimental, gracias por ayudarme a entender los protocolos y enseñarme la forma correcta de usar los equipos.

A la Dra. Gabriela Guzmán, por su asistencia técnica para la obtención de imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión.

A los que han sido mis compañeros de grupo de laboratorio a lo largo de este recorrido, a Lizeth, Perla, Sophia, Estefanía, Jorge y Elías, pues sus cuestionamientos, comentarios y sugerencias, han sido parte de mi proceso de formación y han abonado de gran manera a la mejora de mi trabajo.

A Yaneth, Marco y Alexis, las primeras personas que conocí al llegar a CICESE, a quienes considero una amistad bella y sincera.

A mis amigas, Elizabeth Mavil y Alondra Bulnes, que aun en la distancia han sido parte del proceso y me han dado soporte en los días grises.

A mi familia, mis padres y hermanos, que siempre están ahí para darme ánimos y para motivarme para seguir trabajando por mis sueños.

A Zeydel, mi amado compañero, que se ha convertido en soporte para mí, que me ha motivado a ser mejor en cada aspecto de mi vida y a quien agradezco su apoyo constante en este camino.

A todos y cada uno de los que me apoyaron en este recorrido, muchas gracias.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 <i>Botrytis cinerea</i>	2
1.1.2 La enfermedad del moho gris.....	3
1.1.3 Estrategias de control del moho gris.....	4
1.1.4 Resistencia a los antifúngicos por <i>B. cinerea</i>	5
1.1.5 Nanopartículas de óxido de cobre.....	5
1.1.6 Síntesis verde de nanopartículas de óxido de cobre.....	6
1.1.7 Síntesis de nanopartículas mediada por especies del género <i>Trichoderma</i>	6
1.1.8 Antecedentes de la biosíntesis de nanopartículas mediada por especies del género <i>Trichoderma</i>	8
1.2 Justificación.....	8
1.3 Hipótesis.....	9
1.4 Objetivos.....	9
1.4.1 Objetivo general.....	9
1.4.2 Objetivos específicos.....	9

Capítulo 2. Metodología	11
2.1 Crecimiento de especies de <i>Trichoderma</i> spp.	11
2.2 Ensayos de confrontación.....	12
2.3 Preparación de la biomasa fúngica para la obtención de los sobrenadantes	13
2.4 Elección del sobrenadante a utilizar en la biosíntesis de CuONPs	14
2.5 Biosíntesis de nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs)	15
2.5.1 Determinación de la concentración de CuONPs	16
2.6 Caracterización de las nanopartículas sintetizadas	17
2.7 Determinación <i>in vitro</i> de la actividad antifúngica de las nanopartículas de óxido de cobre contra <i>B. cinerea</i> CDBBH1556	17
2.8 Determinación <i>in vitro</i> de la actividad antifúngica de las nanopartículas de óxido de cobre contra el aislado de <i>B. cinerea</i>	18
2.8.1 Colecta de muestras.....	18
2.8.2 Aislamiento de colonias de hongos.....	18
2.8.2 Selección de aislados.....	19
2.8.3. Identificación molecular del aislado de <i>B. cinerea</i>	19
2.8.4 Determinación de la inhibición del crecimiento del aislado de <i>B. cinerea</i>	19
2.8.5 Comparación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de las nanopartículas de óxido de cobre vs fungicidas comerciales en el aislado de <i>B. cinerea</i>	20
2.9 Análisis estadístico	20
Capítulo 3. Resultados	21
3.1 Ensayos de confrontación en placa	21
3.2 Elección del sobrenadante a utilizar en la biosíntesis de CuONPs	22
3.3 Biosíntesis de CuONPs	22
3.4 Caracterización de las CuONPs	24
3.4.1 Formulación TAP15	25
3.4.2 Formulación TAD15.....	26

3.4.3	Formulación TGP15	27
3.4.4	Formulación TGD15.....	28
3.5	Actividad antifúngica de las CuONPs frente a <i>B. cinerea</i> CDBBH1556	29
3.6	Actividad antifúngica de las CuONP frente a <i>B. cinerea</i> aislada de campo	31
3.6.1	Aislamiento de <i>B. cinerea</i> en campo.....	31
3.6.2	Identificación del aislado sospechoso de <i>B. cinerea</i>	32
3.6.3	Identificación molecular del aislado sospechoso de <i>B. cinerea</i>	33
3.6.4	Inhibición del crecimiento radial del aislado de <i>B. cinerea</i>	33
3.7	Comparación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de las nanopartículas de óxido de cobre vs fungicida comercial en el aislado de <i>B. cinerea</i>	35
Capítulo 4.	Discusión	36
Capítulo 5.	Conclusiones.....	41
Literatura citada		42
Anexos		48

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Enfermedad del moho gris en okra infectada por <i>B. cinerea</i> . A. Fruto infectado, B. Colonia de una semana en medio PDA. C. Esclerocios negros desarrollados en PDA después de dos semanas, D. Conidióforos, E. Conidios. Modificado de Choi et al., 2018.....	2
Figura 2. Ciclo de infección de <i>B. cinerea</i> . Obtenido de Agrios et al., 2005.....	3
Figura 3. Morfología colonial de aislados de <i>Trichoderma</i> spp. A. <i>T. asperellum</i> T8A, B. <i>T. harzianum</i> C4A, C. <i>T. atroviridae</i> , D. <i>T. ghanense</i> C4B, en medio PDA.....	11
Figura 4. Representación del ensayo de confrontación en placa. <i>B. cinerea</i> en confrontación con <i>Trichoderma</i> spp.....	12
Figura 5. Cultivo en medio líquido PDB posterior a los 5 días de incubación. A. <i>T. asperellum</i> T8A, B. <i>T. harzianum</i> C4A, C. <i>T. atroviridae</i> , D. <i>T. ghanense</i> C4B.....	13
Figura 6. Inoculación de cajas con medio envenenado con sobrenadantes de <i>Trichoderma</i> spp.....	14
Figura 7. Colecta de muestras de tejidos con signos y síntomas de enfermedad. A. Plantas de vid, variedad Tempranillo, B. Tallo con signos de infección por hongos, C. Frutos con signos de infección por hongos.....	18
Figura 8. Cocultivo de <i>B. cinerea</i> CDBBH1556 con diferentes cepas de <i>Trichoderma</i>	21
Figura 9. Porcentaje de inhibición de <i>B. cinerea</i> CDBBH1556 en cocultivo con diferentes especies de <i>Trichoderma</i> . Los resultados son la media \pm SD (n=3), *p <0.000 (ANOVA de una vía con un test de Tukey).....	21
Figura 10. Inhibición del crecimiento de <i>B. cinerea</i> CDBBH1556. Los resultados son la media \pm SD (n=3). A) Sobrenadante 1 *p <0.000, Sobrenadante 2 *p <0.000 (ANOVA de una vía con un test de Tukey).	22
Figura 11. CuONPs sintetizadas. A. TGP15, B. TAP15, C. TGD15, D. TAD15.....	24
Figura 12. Caracterización de CuONPs formulación TAP15. A. Determinación del diámetro hidrodinámico, B. Determinación de potencial Z, C. Curva de absorbancia UV-Vis.	25
Figura 13. A. Micrografía de las CuONPs- TAP15, B. Histograma de tamaño de las nanopartículas. n: 1000.....	25
Figura 14. Caracterización de CuONPs formulación TAD15. A. Determinación del diámetro hidrodinámico, B. Determinación del potencial Z, C. Curva de absorbancia UV-Vis.	26
Figura 15. Micrografía de las CuONPs TAD 15.	26
Figura 16. Caracterización de CuONPs formulación TGP15. A. Determinación del diámetro hidrodinámico, B. Determinación del potencial Z, C. Curva de absorbancia UV-Vis.	27

Figura 17. A. Micrografía de las CuONPs TGP15, B. Histograma de tamaño de las nanopartículas. n: 1000.....	288
Figura 18. Caracterización de CuONPs formulación TGD15, A. Determinación del diámetro hidrodinámico, B. Determinación del potencial Z, C. Absorbancia UV-Vis.	28
Figura 19. A. Micrografía de las CuONPs TGD15. B. Histograma de tamaño de las nanopartículas. n: 1000.....	29
Figura 20. Inhibición del crecimiento de <i>B. cinerea</i> CDBBH1556 con los diferentes tratamientos a la misma concentración. Los resultados son la media \pm SD (n=3). *p <0.000 (ANOVA de una vía con un test de Tukey).....	30
Figura 21. Ensayo en medio envenenado. Crecimiento radial de la colonia de <i>B. cinerea</i> CDBBH1556 en diferentes tratamientos. TAP15, TGP15 y TAD15.	301
Figura 22. Características de la morfología colonial del aislado H13 en medio de cultivo PDA. A. crecimiento a los 7 días, B. Crecimiento pasados 15 días.....	322
Figura 23. Estructuras microscópicas del aislado H13 observadas con un microscopio compuesto vertical. A y B. Conidióforos ramificados, C. Conidios ovoides.	32
Figura 24. Árbol filogenético de la región basado en el método de máxima similitud, con valores de bootstrap expresados en porcentaje. <i>B. carolineana</i> fue utilizado como grupo externo.	333
Figura 25. Inhibición del crecimiento de <i>B. cinerea</i> aislado de campo con los diferentes tratamientos.	344
Figura 26. Inhibición del crecimiento de <i>B. cinerea</i> aislado de campo con los diferentes tratamientos con la misma concentración de adición al medio: 42%. Los resultados son la media \pm SD (n=3). *p <0.000 (ANOVA de una vía con un test de Tukey).	34
Figura 27. Ensayo en medio envenenado. Se probó la actividad antifúngica de CuONPs TGD15 y un fungicida comercial frente al aislado de <i>B. cinerea</i>	35

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Mezclas de reacción para la biosíntesis de CuONPs.....	15
Tabla 2. Concentración de tratamientos antifúngicos a comparar.....	20
Tabla 3. Viraje de los experimentos de síntesis	23
Tabla 4. Formulaciones de CuONPs seleccionadas.	24
Tabla 5. Determinación de la CMI de las formulaciones de CuONPs.....	30
Tabla 6. Recuento de aislados obtenidos en los tres muestreos realizados.....	31
Tabla 7. Actividad antifúngica de CuONPs y un fungicida comercial	35
Tabla 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio de <i>B. cinerea</i> CDBBH1556	48
Tabla 9. Inhibición del crecimiento radial de <i>B. cinerea</i> CDBBH1556 con la CMI de cada formulación. Controles añadidos: sobrenadantes, sal precursora y medio sin adición de tratamiento.	49
Tabla 10. Inhibición del crecimiento radial del aislado de <i>B. cinerea</i> . Tratamientos con CuONPs, sobrenadantes, sal precursora y control sin adición.....	50

Capítulo 1. Introducción

La enfermedad del moho gris es causada por el fitopatógeno *Botrytis cinerea*, un hongo necrotrófico que infecta a una amplia variedad de plantas, incluyendo numerosos cultivos de importancia agrícola (Cheung et al., 2020). Este hongo es considerado el segundo patógeno vegetal más importante en frutas y hortalizas frescas, las pérdidas anuales que causa superan los \$100 mil millones de dólares en todo el mundo (Hua et al., 2018).

El control del fitopatógeno requiere de una estrategia integrada que incluya la eliminación de las partes enfermas, un riego y fertilización adecuados, así como la regulación de la humedad. Sin embargo, la aplicación de fungicidas sigue siendo necesaria y se realiza de forma repetitiva para controlar al patógeno. Lo anterior, ha resultado en un aumento en la resistencia a uno o varios de los fungicidas comerciales en poblaciones de este hongo en todo el mundo (Rupp et al., 2017).

En la búsqueda de nuevas estrategias de control para hacer frente a este problema, la nanotecnología se ha presentado como una opción prometedora a través de la aplicación de los nanomateriales. En particular, las nanopartículas metálicas han mostrado tener un alto potencial para ser utilizadas como alternativa de tratamiento a los fungicidas convencionales y/o como adyuvantes en la lucha contra la resistencia a los fungicidas (Kausar et al., 2022; Malandrakis et al., 2022).

Entre las principales nanopartículas que han sido utilizadas en la agricultura se destacan las de plata (Ag), óxido de zinc (ZnO) y óxido de cobre (CuO), las cuales pueden ser obtenidas a través de métodos físicos, químicos y biológicos. De entre ellos, los métodos físicos y químicos han mostrado algunas limitaciones como un alto costo y la generación de residuos que pueden ser tóxicos para el medio ambiente. Por otro lado, la biosíntesis a través del aprovechamiento de recursos biológicos como los hongos, se ha presentado como una alternativa sencilla, a gran escala, económica y que busca ser respetuosa con el medio ambiente (Ramírez-Valdespino & Orrantia-Borunda, 2021).

En este estudio, se realizó la biosíntesis de nanopartículas de óxido de cobre mediante un método biológico utilizando extractos de *Trichoderma ghanense* y *Trichoderma asperellum*. Posteriormente, se evaluó *in vitro* su actividad antifúngica contra *B. cinerea*, el agente causal del moho gris. Esta innovadora aproximación busca ofrecer una alternativa sostenible y efectiva para el control de este fitopatógeno.

1.1 Antecedentes

1.1.1 *Botrytis cinerea*

Botrytis es un género de hongos muy diversos que incluye numerosas especies que difieren en su biología, ecología, características y rango de hospedantes (Poveda et al., 2020). De entre las especies que integran este género, el hongo *B. cinerea* (teleomorfo *Botryotinia fuckeliana*) fue descrito por primera vez por Christiaan Hendrik Persoon en 1794, pertenece a la familia Sclerotiniaceae de la clase Leotimycetes. Se trata de un patógeno vegetal necrotrófico, considerado como la especie con mayor patogenicidad del género *Botrytis*, debido a sus modos de acción flexibles, alto rendimiento reproductivo, amplia gama de hospederos y capacidad de sobrevivir durante períodos prolongados como conidios y/ o pequeñas masas de micelio endurecido llamadas esclerocios. Sus hospederos principales son plantas dicotiledóneas, aunque pueden llegar a afectar a las monocotiledóneas bajo condiciones particulares. Entre sus hospederos principales se encuentra la vid, la fresa, el tomate, el pepino y las flores ornamentales (Cheung et al., 2020; Bi et al., 2023).

Botrytis cinerea, es un hongo que infecta el tejido vegetal (Figura 1A). Se identifica principalmente por sus características morfológicas, produce abundante micelio gris (Figura 1B), con frecuencia forma esclerocios, estructuras de resistencia, que son duros, planos e irregulares (Figura 1C), sus conidióforos son largos y ramificados (Figura 1D) y posee células apicales redondeadas con racimos de conidios ovoides unicelulares (Figura 1E). Sus conidios se liberan fácilmente en climas húmedos y son transportados por las corrientes de aire (Agrios et al., 2005).

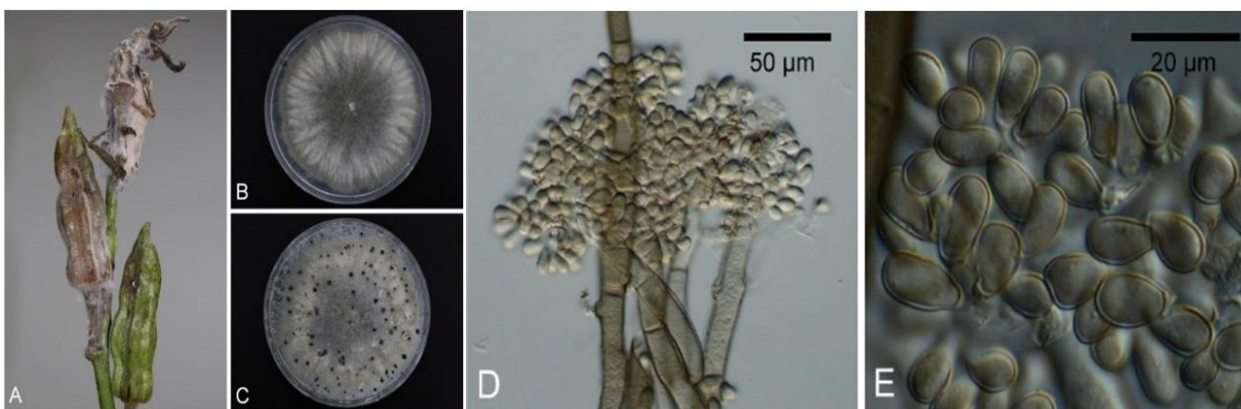


Figura 1. Enfermedad del moho gris en okra infectada por *B. cinerea*. A. Fruto infectado, B. Colonia de una semana en medio PDA. C. Esclerocios negros desarrollados en PDA después de dos semanas, D. Conidióforos, E. Conidios. Modificado de Choi et al., 2018.

1.1.2 La enfermedad del moho gris

La enfermedad que causa *B. cinerea* se conoce como “la enfermedad del moho gris”. Los síntomas que se presentan pueden variar en función de la planta infectada y el estado fisiológico del tejido. En frutos blandos y hojas suelen presentarse pudriciones blandas, acompañadas por el colapso y la absorción de agua por los tejidos del parénquima, lo que va seguido de la aparición de los signos de la presencia del patógeno con la formación de masas grises de conidios (Williamson et al., 2007). Su principal modo de transmisión es por el aire, debido a que las esporas de conidios asexuales de conidióforos maduros sirven como principal medio de transmisión, mientras que los micelios de esclerocios y otros tejidos infectados funcionan únicamente como inóculo alternativo (Cheung et al., 2020). En muchas frutas y verduras, la infección comienza en las flores senescentes adheridas, y luego una pudrición blanda se propaga para afectar a la fruta adyacente en desarrollo (Figura 2). El proceso de infección inicia de forma predominante con los macroconidios, su principal estructura de dispersión, los cuales se adhieren y germinan en la superficie de la planta, es entonces que los tubos germinativos, conforme se alargan se diferencian en apresorios simples, que son las estructuras especializadas que facilitan la penetración del tejido del hospedero (Agrios et al., 2005; Bi et al., 2023).

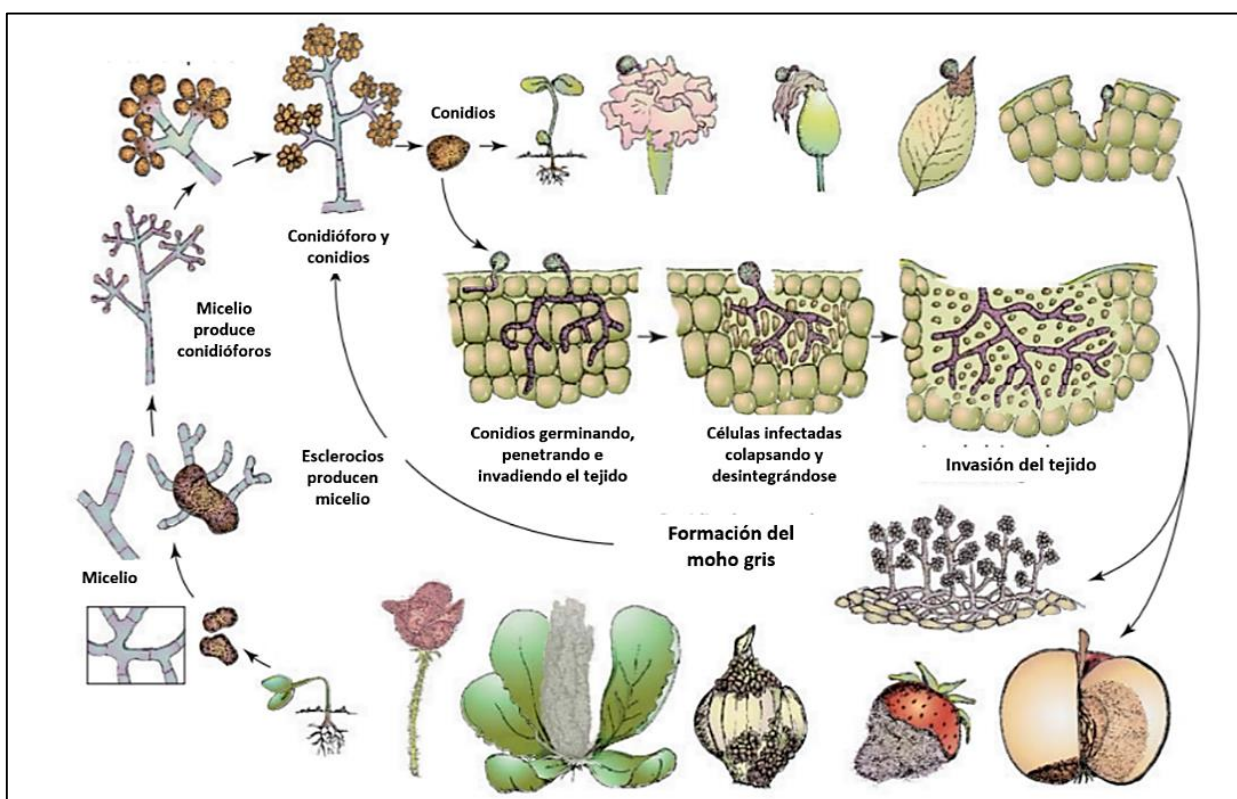


Figura 2. Ciclo de infección de *B. cinerea*. Obtenido de Agrios et al., 2005.

La fase temprana se caracteriza por la formación de focos de infección locales sin diseminación, seguida de una etapa tardía caracterizada por la producción de abundante biomasa (Agrios et al., 2005; Bi et al., 2023). Además, los esclerocios, son las estructuras de resistencia que le permiten sobrevivir bajo condiciones adversas, que luego germinan para producir micelio y macroconidios cuando se reestablecen condiciones favorables. Este hongo puede reproducirse de forma sexual y asexual y los esclerocios también son funcionales durante la reproducción sexual del hongo, estos son fecundados por los microconidios provenientes de un aislado de tipo sexual opuesto. La fecundación exitosa da lugar al desarrollo de los cuerpos fructíferos, los apotecios, donde se producen las ascosporas, que también pueden dispersarse e infectar los tejidos del huésped. De modo que, todo el arsenal de factores de patogenicidad del hongo, junto con su versatilidad en la reproducción y dispersión hacen que este patógeno sea difícil de controlar (Acosta Morel et al., 2021).

1.1.3 Estrategias de control del moho gris

El control del moho gris requiere de toda una estrategia en la que se integra la eliminación de las partes enfermas de la planta, regulación de la humedad, así como la adquisición de plantas sanas de invernadero, sin embargo, ninguno de los métodos antes mencionados puede proveer una eficacia de control similar a la proporcionada por los fungicidas, por lo que aún es el método principal ante condiciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad (Zapata-Narváez et al., 2023).

Existe una amplia gama de fungicidas que pertenecen a varias clases químicas y con diferentes sitios de acción, que pueden ser clasificados en cinco categorías, los que actúan sobre la respiración, el ensamblaje de microtúbulos, la osmorregulación, la biosíntesis de esteroides y aquellos cuyos efectos pueden revertirse con la metionina. No obstante, existen dos problemas principales en la aplicación de fungicidas.

En primer lugar, *Botrytis* ha demostrado cambios frecuentes de generación en generación debido a sus conidios multinucleados, lo que resulta en la aparición constante de cepas resistentes a diversas categorías de fungicidas. Por otro lado, la aplicación de fungicidas sintéticos es costoso ya que se ha visto que se requieren dosis altas. Además, se ha reportado que el costo del control de este fitopatógeno representa al menos el 8% del mercado mundial de fungicidas. Sin embargo, aspectos como la inocuidad alimentaria, efectos nocivos sobre el ambiente y la salud humana, así como la aparición de cepas resistentes, limitan cada vez más el uso de estos productos (Sabine Fillinger & Yigang Elad, 2016; Hua et al., 2018).

1.1.4 Resistencia a los antifúngicos por *B. cinerea*

En muchos cultivos hortofrutícolas, el moho gris es la enfermedad fúngica más grave y para controlar al patógeno, se ha vuelto necesario aplicar fungicidas de manera constante, especialmente en zonas con climas templados y húmedos. Entre los grupos de fungicidas utilizados generalmente, se incluyen: inhibidores externos de quinona (QoI), inhibidores de la enzima succinato deshidrogenasa (SDHI), anilino pirimidinas e hidroxianilidas. Estos fungicidas se utilizan contra el fitopatógeno a frecuencias que varían en función del cultivo y entre los cultivos tratados con mayor intensidad en todo el mundo están las fresas, frambuesas, uvas y tomates (Rupp et al., 2017).

Por muchos años, los tratamientos fungicidas fueron esenciales para mantener sanos los cultivos, sin embargo, el uso continuo de fungicidas con los mismos modos de acción puede conducir al desarrollo de resistencia, lo cual ya se ha presentado en numerosos patógenos vegetales y representa una seria amenaza para la protección eficaz de los cultivos (Yin et al., 2023).

Botrytis cinerea es un patógeno de alto riesgo para el desarrollo de resistencia a fungicidas. Dentro de las poblaciones de hongos, las cepas han desarrollado múltiples mutaciones en diferentes genes diana que conducen a la resistencia múltiple o mutaciones asociadas con la sobreexpresión de transportadores de flujo que conduce a la resistencia múltiple a fármacos (Sofianos et al., 2023). En la actualidad, el control de la enfermedad del moho gris se ha visto dificultado por la eficacia reducida e incluso el fracaso del control químico, por lo cual, en la última década se han implementado diversas estrategias, incluidas prácticas biológicas y el desarrollo de formulaciones, para controlar la resistencia a fungicidas de este patógeno vegetal (Shao et al., 2021).

1.1.5 Nanopartículas de óxido de cobre

La nanotecnología ha permitido la fabricación de una amplia clase de materiales con un tamaño dentro de un rango aproximado de 1 a 100 nm, a los que se les denomina nanomateriales o nanopartículas (Waris et al., 2021). Las nanopartículas están formadas por una capa superficial que puede fusionarse con otras moléculas pequeñas, iones metálicos, tensoactivos y polímeros; la capa de la cubierta, que es un material químicamente diferente al núcleo en todos los aspectos; y el núcleo, que es la porción central de la nanopartícula (Khan et al., 2019). A escala nanométrica la materia presenta propiedades significativamente diferentes a las de una escala mayor, pues el área de superficie relativa se ve

aumentada y a medida que el tamaño se reduce, cambian significativamente sus propiedades ópticas, magnéticas o eléctricas (Khan et al., 2019; Al-Hakkani, 2020).

El cobre (Cu), en forma de nanomaterial, exhibe propiedades excepcionales, tales como un aumento en el área superficial, reactividad química, resistencia física, magnetismo y efectos ópticos. Además, el Cu es un microelemento fundamental en la mejora y el crecimiento de las plantas. Se trata de un cofactor de superóxido fenol oxidasas, ascorbato oxidasas, así como una parte de las proteínas reguladoras y está involucrado en la cadena transportadora de electrones durante la fotosíntesis y la respiración (Kausar et al., 2022). Actualmente, las nanopartículas a base de cobre (CuNP) o de óxido de cobre (CuONP) están siendo utilizadas cada vez más en nanoformulaciones y agroquímicos para la entrega eficiente y la liberación controlada de pesticidas, fertilizantes y antimicrobianos, pues han mostrado tener buena actividad inhibiendo el desarrollo de algunos microorganismos, entre ellos, los hongos (Gaba et al., 2022).

1.1.6 Síntesis verde de nanopartículas de óxido de cobre

La síntesis de nanopartículas se lleva a cabo desde diferentes métodos: físicos, químicos y biológicos. De forma general, estos son clasificados en dos enfoques: el enfoque “de arriba hacia abajo”, donde el material de interés es sometido a procesos de reducción de tamaño y el de “abajo hacia arriba”, donde las nanopartículas se construyen a partir de átomos, moléculas y partículas, es decir, de monómeros más pequeños (Baig et al., 2021).

La síntesis a través de métodos físicos y químicos ha mostrado tener algunas limitaciones como un alto consumo de energía, alto costo de producción y la generación de residuos tóxicos que causan efectos desfavorables al medio ambiente (Waris et al., 2021). En la búsqueda de nuevas alternativas de producción, las rutas verdes se presentan como soluciones ecológicas, rentables, seguras, estables y de mayor vida útil. Entre los recursos bióticos que han sido utilizados para la producción de nanopartículas de cobre se encuentran las plantas, bacterias, algas y hongos (Al-Hakkani, 2020).

1.1.7 Síntesis de nanopartículas mediada por especies del género *Trichoderma*

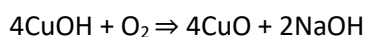
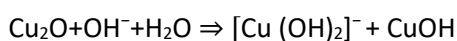
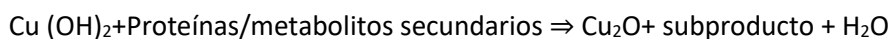
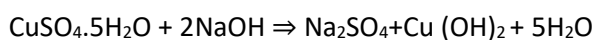
Los hongos, se han destacado por su alto potencial para la biosíntesis de nanopartículas, lo que se ha relacionado a su alta producción de metabolitos secundarios entre los que se incluyen policétidos,

peptaiboles, terpenos, pirones, dicetopiperazina, fenoles, alcaloides, enzimas y glicolípidos (Chakraborty et al., 2022). Los mecanismos exactos involucrados en la síntesis de nanopartículas no están del todo claros, sin embargo, muchas investigaciones sugieren que la formación de las nanopartículas está relacionada con enzimas reductoras entre ellas: reductasas dependientes de NADH o NADPH, nitrato (NO⁻³) y nitrito (NO⁻²) reductasas, presentes en las paredes celulares, membranas citoplasmáticas o intracelularmente (Li et al., 2022).

Se ha explorado la capacidad que poseen una gran variedad de especies de hongos en la síntesis de nanopartículas de óxido de cobre y otras nanopartículas metálicas, entre las especies utilizadas están las del género *Trichoderma*, que se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, poseen alta tolerancia a los metales y han demostrado ser excelentes agentes de control biológico y promotores de crecimiento de plantas (Ramírez- Valdespino & Orrantia-Borunda, 2021).

El posible mecanismo de síntesis de nanopartículas de CuO mediada por *Trichoderma* podría explicarse con base en las descripciones proporcionadas en el trabajo de Gaba et al. (2022) y Nagajyothi et al. (2017) (ecuación 1).

El primer paso consiste en la reducción del ion Cu²⁺ al estado cobervalente por el anión hidroxilo de las moléculas de agua presentes en el filtrado del cultivo. Se ha sugerido que el anión hidroxilo de las moléculas de agua presentes en el filtrado actúan como agente reductor y forma un estado intermedio hidróxido de cobre [Cu(OH)₂]. Después de eso, en el segundo paso, los metabolitos activos y las proteínas presentes en los extractos libres de células convierten la forma [Cu(OH)₂] en Cu₂O. El tercer paso de la reacción es cuando se elimina el hidrógeno en forma de hidróxido de cobre. Después de un tiempo prologando de reacción se forman las nanopartículas estables de óxido de cobre (Nagajyothi et al., 2017; Gaba et al., 2022).



(1)

1.1.8 Antecedentes de la biosíntesis de nanopartículas mediada por especies del género *Trichoderma*

En estudios previos se ha logrado realizar la biosíntesis de nanopartículas de óxido de cobre con especies de *Trichoderma*, como en el trabajo realizado por Saravanakumar y colaboradores (2018), en el que se utilizó extracto libre de células de *T. asperellum* para la formación de las nanopartículas de óxido de cobre, y como resultado se obtuvieron nanopartículas esféricas con un tamaño de 10 a 190 nm, con un diámetro promedio de 110 nm. Por otro lado, ya hay estudios en los que se ha explorado la actividad antifúngica de las CuONPs. En un trabajo de Consolo y colaboradores (2020) donde las nanopartículas fueron sintetizadas mediante el empleo del filtrado celular de una cepa de *T. harzianum*, las nanopartículas mostraron actividad inhibitoria en el crecimiento frente a los fitopatógenos: *Alternaria alternata* y *Pyricularia oryzae*, lo que destaca su potencial en las aplicaciones agrícolas.

Un trabajo más reciente fue el de Sadek y colaboradores (2022) en el que se evaluó *in vitro* la actividad antifúngica de nanopartículas de azufre y cobre contra *B. cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* en comparación con el fungicida Topsin-M 70 WP. En este trabajo las nanopartículas a base de cobre mostraron una reducción significativa en el crecimiento micelial de los fitopatógenos en concentraciones de 5 a 100 µg/mL en comparación al fungicida de referencia Topsin-M que requirió concentraciones de 1000 µg/mL.

Como se ha mencionado, las nanopartículas de óxido de cobre poseen un alto potencial para ser utilizadas como alternativa de control para el fitopatógeno *B. cinerea*. Si bien es posible realizar la síntesis de nanopartículas por métodos físicos y químicos, actualmente, se busca transitar a métodos de síntesis verde, con los cuales disminuir el impacto que tienen al medio ambiente estos procesos. En este proyecto, se llevó a cabo la biosíntesis de nanopartículas de óxido de cobre utilizando el sobrenadante de dos especies del género *Trichoderma*. Las especies de este género secretan un arsenal de metabolitos secundarios que no solo inhiben el desarrollo de fitopatógenos, sino que también son aprovechados durante la síntesis de nanopartículas.

1.2 Justificación

Botrytis cinerea es un fitopatógeno necrotrófico que por su amplio rango de hospederos es considerado como el segundo patógeno vegetal más importante a nivel mundial. Las pérdidas económicas que causa

superan los \$100 mil millones de dólares en todo el mundo.

Por muchos años la estrategia principal de control de este fitopatógeno ha sido la aplicación de fungicidas que actúan sobre sitios específicos impidiendo el desarrollo del microorganismo. Sin embargo, su aplicación repetitiva ha dado lugar a la aparición de grupos de hongos que muestran resistencia a uno o varios de ellos. En la búsqueda de nuevas estrategias de control que puedan hacer frente a esta problemática, los avances recientes en nanotecnología representan una alternativa a través de la aplicación de las nanopartículas obtenidas por síntesis verde. Por ello en este trabajo, se propone una alternativa de tratamiento contra el fitopatógeno a través del uso de nanopartículas de óxido de cobre biosintetizadas con el sobrenadante de dos especies del género *Trichoderma*: *T. ghanense* C4B y *T. asperellum* T8A.

1.3 Hipótesis

Las nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas a partir de metabolitos extracelulares del hongo *Trichoderma* spp. presentarán actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Obtener nanopartículas de óxido de cobre utilizando el sobrenadante del hongo *Trichoderma* spp. y determinar sus propiedades antifúngicas contra *Botrytis cinerea*.

1.4.2 Objetivos específicos

- Obtener nanopartículas de óxido de cobre a través de los metabolitos extracelulares del hongo *Trichoderma* spp.
- Determinar las características fisicoquímicas de las nanopartículas de óxido de cobre.

- Evaluar la actividad antifúngica de las nanopartículas de óxido de cobre contra *Botrytis cinerea* CDBBH1556.
- Evaluar la actividad antifúngica de las nanopartículas de óxido de cobre contra *Botrytis cinerea* aislada de campo.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Crecimiento de especies de *Trichoderma* spp.

Los hongos *T. asperellum* T8A, *T. harzianum* C4A, *T. ghanense* C4B y *T. atroviridae* fueron inoculados en cajas Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo Agar papa-dextrosa (PDA). Para ello se colocó un disco de micelio en el centro de la caja y luego se selló con parafilm. Posteriormente, las cajas fueron incubadas a 30 °C por tres días en oscuridad y dos días en luz para la formación de conidios (Figura 3). Una vez pasados los cinco días los conidios fueron colectados y resguardados en un tubo eppendorf con 30% de glicerol y se mantuvieron en congelación a -20 °C.

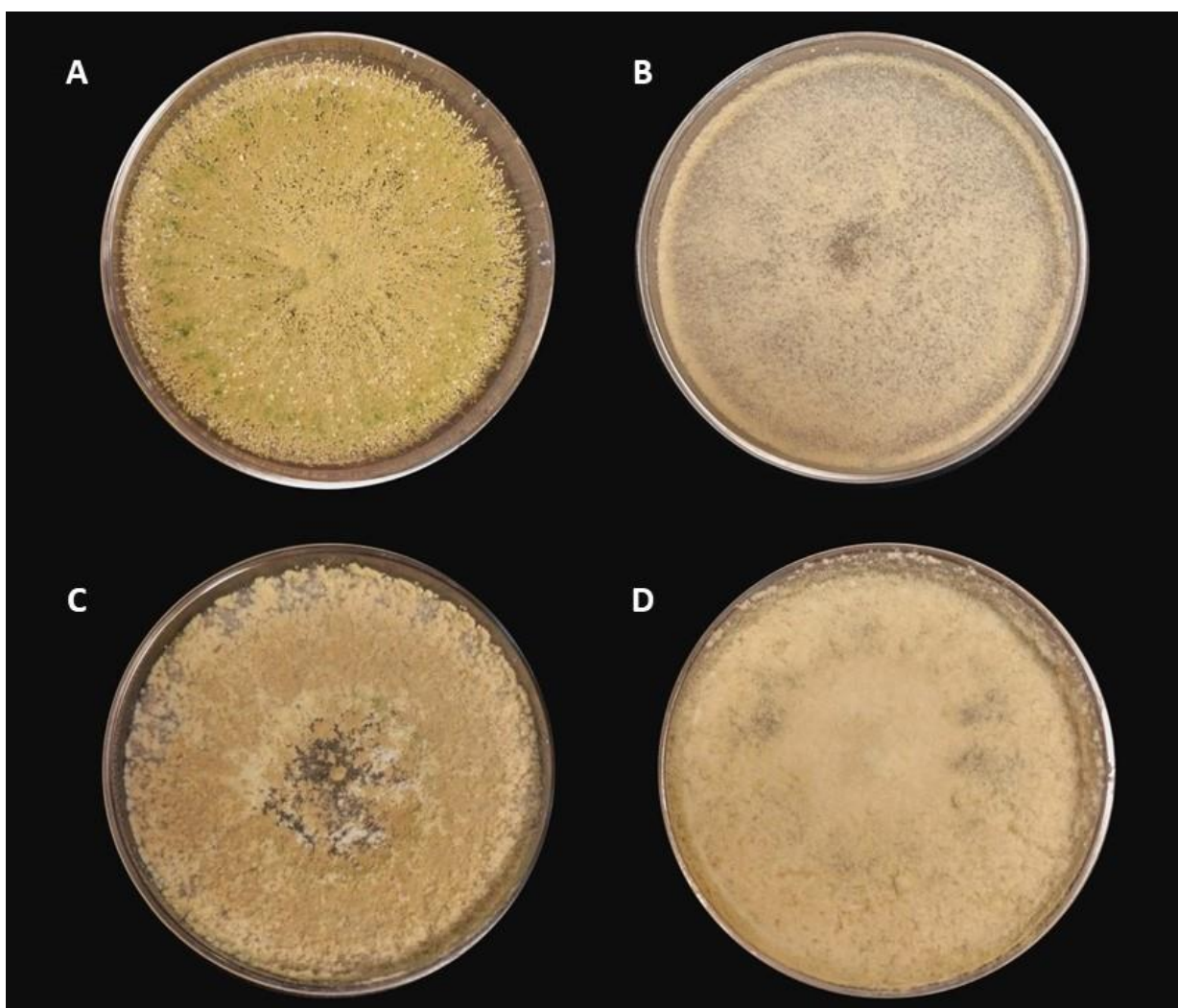


Figura 3. Morfología colonial de asilados de *Trichoderma* spp. A. *T. asperellum* T8A, B. *T. harzianum* C4A, C. *T. atroviridae*, D. *T. ghanense* C4B, en medio PDA.

2.2 Ensayos de confrontación

Se realizó el cocultivo de cada especie *Trichoderma* (*T. asperellum* T8A, *T. harzianum* C4A, *T. ghanense* C4B y *T. atroviridae*) y *B. cinerea* CDBBH1556 en cajas de petri de 50 mm de diámetro con medio de cultivo PDA. Las cajas se inocularon por picadura, se tomó una porción de micelio con el asa y los inóculos se colocaron en el extremo de cada lado de las placas de forma simétrica (Figura 4). El experimento fue realizado por triplicado y se utilizó como control de *B. cinerea* CDBB-H-1556 solo en el mismo medio. Se tomaron los valores del crecimiento al final del experimento y para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la ecuación que se presenta a continuación.

$$IR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100 \quad (2)$$

De donde:

R1: Crecimiento radial de *B. cinerea* en placas control

R2: Crecimiento radial de *B. cinerea* en cocultivo con *Trichoderma* spp.

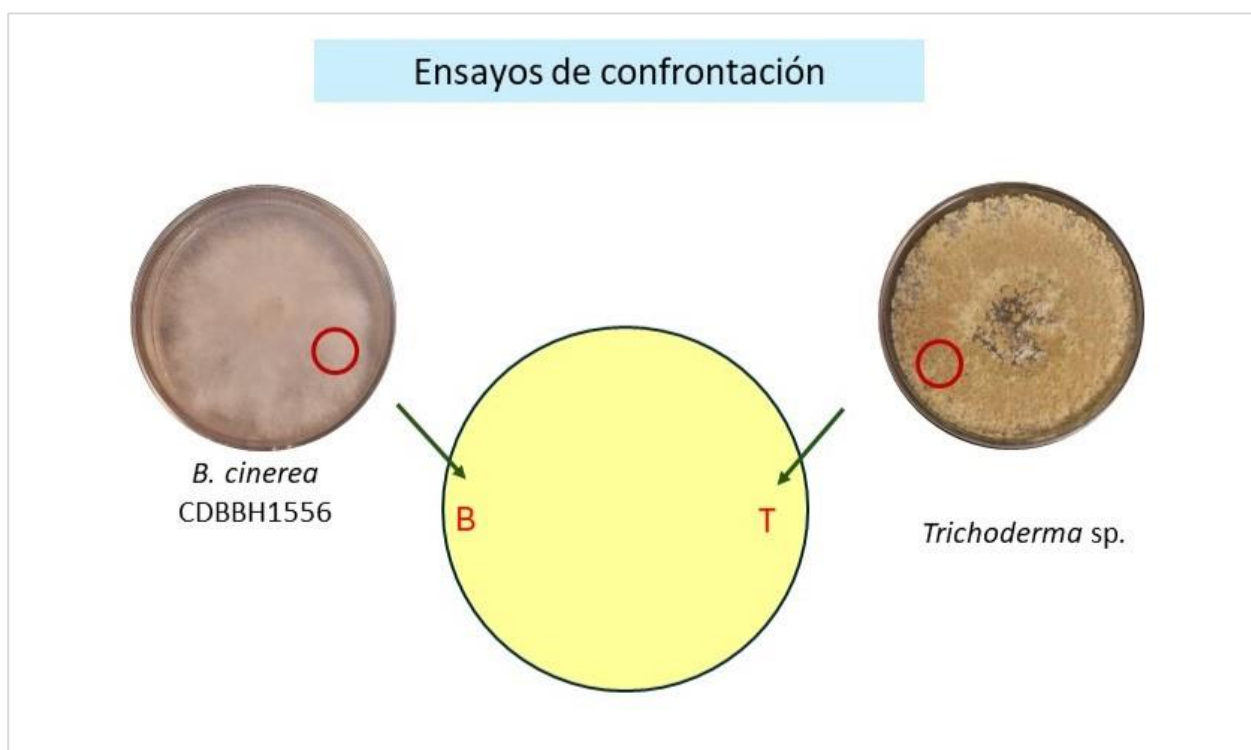


Figura 4. Representación del ensayo de confrontación en placa. *B. cinerea* en confrontación con *Trichoderma* spp.

2.3 Preparación de la biomasa fúngica para la obtención de los sobrenadantes

Se colocaron 250 mL del medio de cultivo de papa dextrosa (PDB) en matraces de 500 mL, cada matraz fue inoculado con una concentración de conidios de 1×10^6 . Los medios inoculados se mantuvieron en agitación constante por 5 días a 130 rpm y a 25 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se llevó a cabo la separación de la biomasa y el sobrenadante (Figura 5) para ello se usó un embudo de filtración cubierto de fibra sintética estéril. El sobrenadante recuperado se filtró con una membrana con poros de $0.45 \mu\text{m}$ en una cámara de extracción y luego se realizó un segundo filtrado a través de una membrana con poros de $0.22 \mu\text{m}$ con una jeringa de 50 mL. Los sobrenadantes filtrados se identificaron como SN1 y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

La biomasa obtenida de los cultivos se pesó y colocó en matraces con agua desionizada estéril en una proporción 1:10 (biomasa: agua) y se incubó por tres días a 25 °C y 130 rpm. Posteriormente, se separó el sobrenadante, y de la misma manera fue filtrado. Estos sobrenadantes se identificaron como SN2 y fueron mantenidos en refrigeración para su uso posterior.

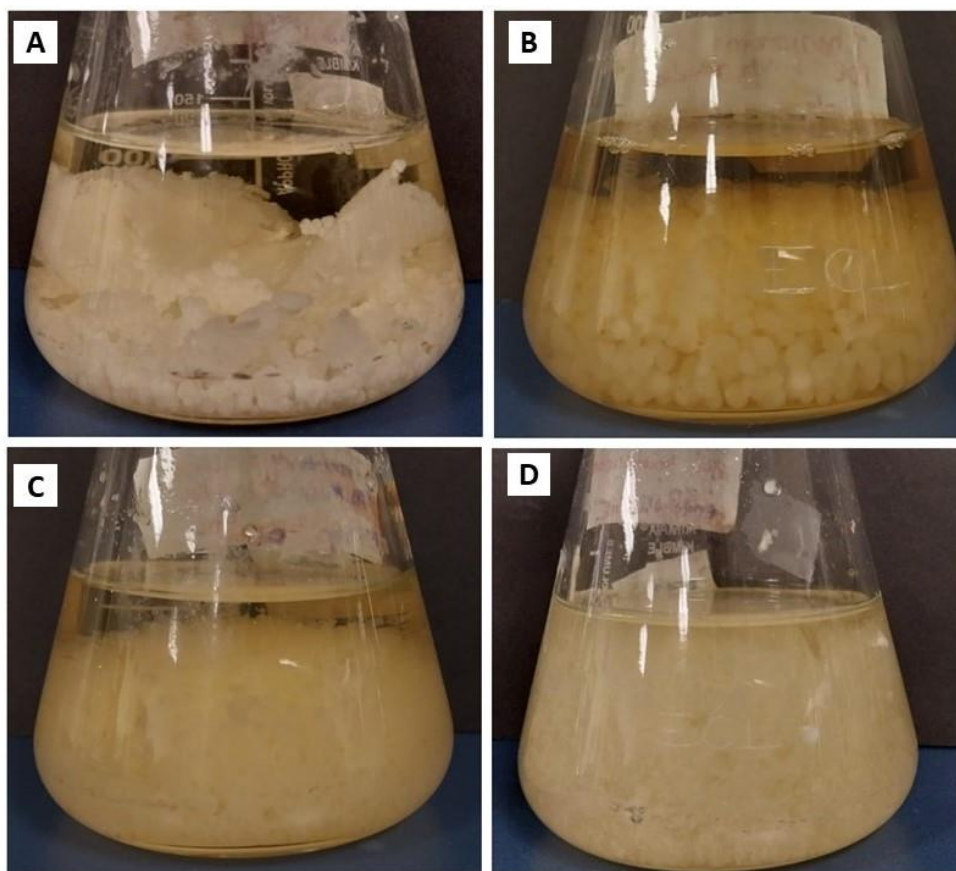


Figura 5. Cultivo en medio líquido PDB posterior a los 5 días de incubación. A. *T. asperellum* T8A, B. *T. harzianum* C4A, C. *T. atroviridae*, D. *T. ghanense* C4B.

2.4 Elección del sobrenadante a utilizar en la biosíntesis de CuONPs

Para la elección del sobrenadante a utilizar en la biosíntesis de CuONPs se realizaron ensayos *in vitro* de medio envenenado (Figura 6). Para ello, se adicionaron los sobrenadantes obtenidos de las diferentes especies de *Trichoderma* al medio de cultivo PDA a una concentración del 20%. Para determinar la actividad de inhibición de los sobrenadantes en el crecimiento micelial, se tomaron discos de 5 mm de los bordes de la colonia del hongo y fueron colocados en el centro de la placa con medio envenenado, posteriormente se tomaron las medidas de crecimiento radial de las colonias a las 24, 48, 72 y 96 h de incubación. El experimento terminó cuando la colonia del hongo llenó la caja del control. Las medidas del crecimiento radial se utilizaron para realizar el cálculo del porcentaje de inhibición. Los sobrenadantes con mayor inhibición del crecimiento del fitopatógeno fueron elegidos para llevar a cabo la reacción de síntesis de nanopartículas de óxido de cobre.

$$IR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100 \quad (3)$$

De donde:

R1: Crecimiento radial de *B. cinerea* en placas control

R2: Crecimiento radial de *B. cinerea* en placas con medio envenenado

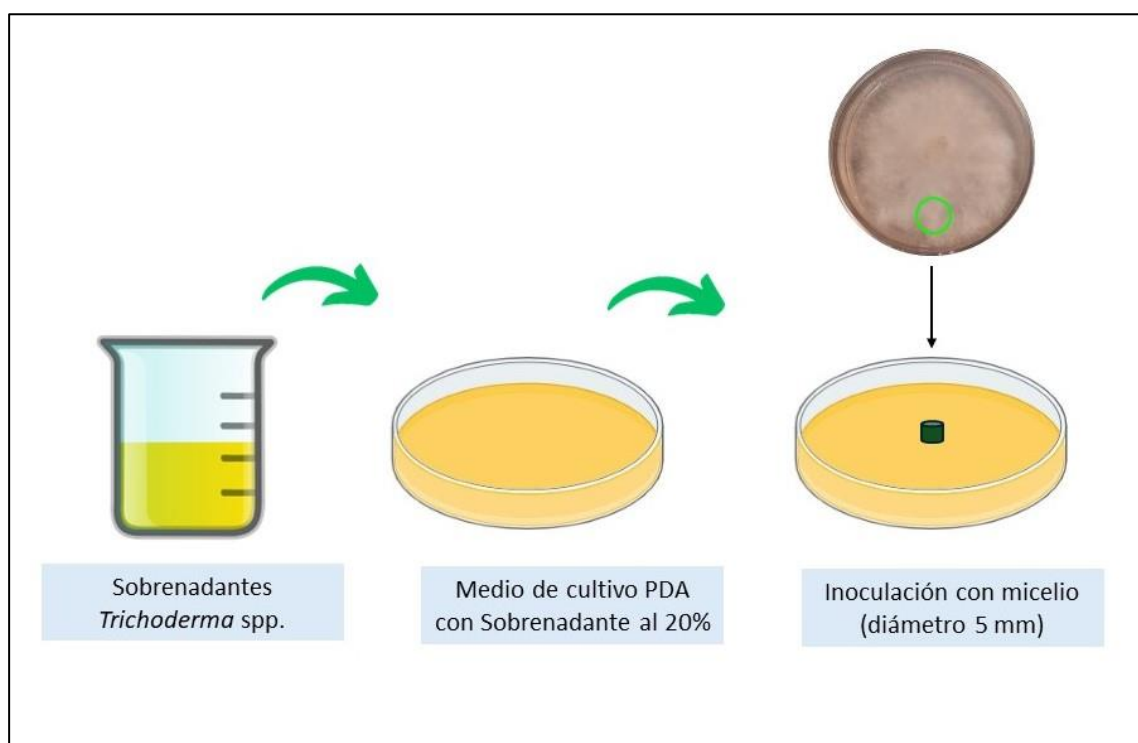


Figura 6. Inoculación de cajas con medio envenenado con sobrenadantes de *Trichoderma* spp.

2.5 Biosíntesis de nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs)

Tabla 1. Mezclas de reacción para la biosíntesis de CuONPs.

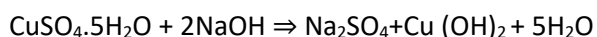
Experimentos de síntesis					
Numero	Clave de identificación	Sobrenadante	Concentración de CuSO ₄ ·5H ₂ O	pH	Temperatura
1	1-TGP10	SN1 <i>T. ghanense</i>	10 mM	10	24 °C
2	2-TGP15	SN1 <i>T. ghanense</i>	15 mM	10	24 °C
3	3-TGP10	SN1 <i>T. ghanense</i>	10 mM	11	24 °C
4	4-TGP15	SN1 <i>T. ghanense</i>	15 mM	11	24 °C
5	5-TGD10	SN2 <i>T. ghanense</i>	10 mM	10	24 °C
6	6-TGD15	SN2 <i>T. ghanense</i>	15 mM	10	24 °C
7	7-TGD10	SN2 <i>T. ghanense</i>	10 mM	11	24 °C
8	8-TGD15	SN2 <i>T. ghanense</i>	15 mM	11	24 °C
9	9-TAP10	SN1 <i>T. asperellum</i>	10 mM	10	24 °C
10	10-TAP15	SN1 <i>T. asperellum</i>	15 mM	10	24 °C
11	11-TAP10	SN1 <i>T. asperellum</i>	10 mM	11	24 °C
12	12-TAP15	SN1 <i>T. asperellum</i>	15 mM	11	24 °C
13	13-TAD10	SN2 <i>T. asperellum</i>	10 mM	10	24 °C
14	14-TAD15	SN2 <i>T. asperellum</i>	15 mM	10	24 °C
15	15-TAD10	SN2 <i>T. asperellum</i>	10 mM	11	24 °C
16	16-TAD15	SN2 <i>T. asperellum</i>	15 mM	11	24 °C
17	17-TGP20	SN1 <i>T. ghanense</i>	20 mM	10	24 °C
18	18-TGP30	SN1 <i>T. ghanense</i>	30 mM	10	24 °C
19	19-TGP20	SN1 <i>T. ghanense</i>	20 mM	11	24 °C
20	20-TGP30	SN1 <i>T. ghanense</i>	30 mM	11	24 °C
21	21-TGD20	SN2 <i>T. ghanense</i>	20 mM	10	24 °C
22	22-TGD30	SN2 <i>T. ghanense</i>	30 mM	10	24 °C
23	23-TGD20	SN2 <i>T. ghanense</i>	20 mM	11	24 °C
24	24-TGD30	SN2 <i>T. ghanense</i>	30 mM	11	24 °C
25	25-TAP20	SN1 <i>T. asperellum</i>	20 mM	10	24 °C
26	26-TAP30	SN1 <i>T. asperellum</i>	30 mM	10	24 °C
27	27-TAP20	SN1 <i>T. asperellum</i>	20 mM	11	24 °C
28	28-TAP30	SN1 <i>T. asperellum</i>	30 mM	11	24 °C
29	29-TAP20	SN2 <i>T. asperellum</i>	20 mM	10	24 °C
30	30-TAP30	SN2 <i>T. asperellum</i>	30 mM	10	24 °C
31	31-TAP20	SN2 <i>T. asperellum</i>	20 mM	11	24 °C
32	32-TAP30	SN2 <i>T. asperellum</i>	30 mM	11	24 °C
33	33-TGD15	SN2 <i>T. ghanense</i>	15 mM	8	24 °C
34	34-TGD30	SN2 <i>T. ghanense</i>	30 mM	8	24 °C
35	35-TAD15	SN2 <i>T. asperellum</i>	15 mM	8	24 °C
36	36-TAD30	SN2 <i>T. asperellum</i>	30 mM	8	24 °C

Se eligieron los SN1 y SN2 de *T. asperellum* T8A y *T. ghanense* C4B para llevar a cabo los experimentos de síntesis de nanopartículas. El sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄·5H₂O) funcionó como el precursor

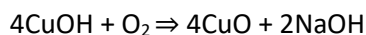
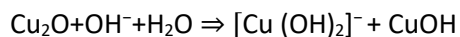
metálico y una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M se usó para realizar el ajuste de pH. La mezcla de reacción se realizó en proporción 1:2 (sobrenadante: sulfato de cobre) y se probaron diferentes concentraciones de sal precursora y valores de pH, como se presenta en la Tabla 1. Posteriormente la solución se incubó por 24 h a temperatura ambiente (24 °C) y en oscuridad.

2.5.1 Determinación de la concentración de CuONPs

Relación estequiométrica y formación de CuO de acuerdo con la ecuación 1, presentada en el capítulo anterior.



(1)



La relación estequiométrica indica que 1 mol de CuO se forma por cada mol de CuOH. Para calcular la cantidad de moles de CuO formados:

- Volumen de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ añadido a la solución: 10 mL
- Moles de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.00015 mol.
- Concentración sal precursora ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): 15 mM.
- Masa molar de CuO: 79.55 g/mol.

$$\text{Masa de CuO} = \text{moles de CuO} \times \text{masa molar de CuO}$$

(4)

$$\text{Masa de CuO} = 0.0015 \text{ mol} \times 79,550 \text{ mg/mol}$$

$$\text{Masa de CuO} = 11.9325 \text{ mg}$$

Por lo tanto, las formulaciones sintetizadas a través de la mezcla de reacción de sal precursora y sobrenadante en una relación 1:2, tomando como volumen final: 30 mL, tienen una concentración de CuO de: 0.3977 mg/ mL.

2.6 Caracterización de las nanopartículas sintetizadas

Las nanopartículas sintetizadas fueron caracterizadas a través de espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis), dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). La caracterización por UV-Vis se realizó con un espectrofotómetro Perkin Elmer precisely UV-VIS lambda/25 y las mediciones fueron realizadas en el rango 200-700 nm. Con el objetivo de determinar el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta (potencial Z) de las CuONPs, las mediciones DLS se llevaron a cabo con un equipo Zetasizer Nano zs90 marca Malvern.

Para determinar la morfología y el tamaño de las CuONPs se utilizó un microscopio de transmisión Hitachi H7500. Para ello, se colocaron 10 µl de las CuONPs en rejillas de cobre de 75 de malla y estas se dejaron secar a temperatura ambiente. Por último, las muestras fueron analizadas a 80 y 100 kV para la captura de las imágenes.

2.7 Determinación *in vitro* de la actividad antifúngica de las nanopartículas de óxido de cobre contra *B. cinerea* CDBBH1556

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) se llevó a cabo el ensayo de medio envenenado, que consiste en la adición de las diferentes formulaciones de nanopartículas al medio de cultivo PDA a diferentes concentraciones: 130, 140, 150, 160, 170 µg/mL. Luego se realizó la inoculación de las placas con tapones de micelio de 5 mm de diámetro, los cuales fueron colocados en el centro de cada placa y se incubaron a 25 °C, se tomaron mediciones a las 24, 48 y 72 h post-inoculación.

En todos los casos se realizó cada ensayo por triplicado, utilizando como control el crecimiento del hongo en el mismo medio de cultivo, pero sin la adición de los tratamientos. El experimento terminó cuando la colonia del fitopatógeno llenó por completo la caja del control y para el cálculo del porcentaje de inhibición se utilizó la ecuación 2.

2.8 Determinación *in vitro* de la actividad antifúngica de las nanopartículas de óxido de cobre contra el aislado de *B. cinerea*

Para realizar las pruebas de actividad inhibitoria de las formulaciones de nanopartículas de *B. cinerea* aislado de campo, se tomaron muestras hojas, tallos y frutos con síntomas de infección, para el aislamiento del fitopatógeno que se describe a continuación (Figura 7).

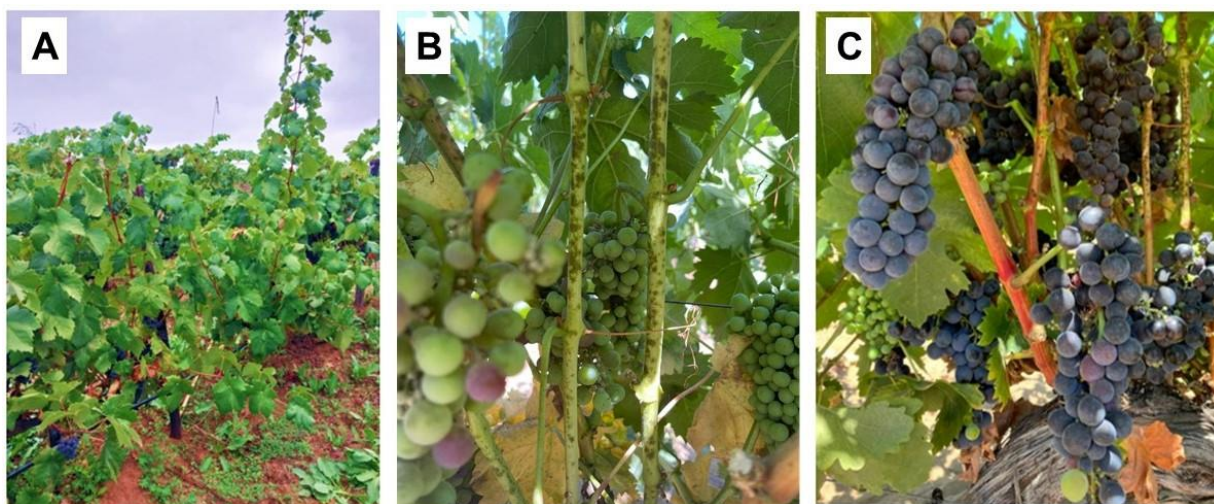


Figura 7. Colecta de muestras de tejidos con signos y síntomas de enfermedad. A. Plantas de vid, variedad Tempranillo, B. Tallo con signos de infección por hongos, C. Frutos con signos de infección por hongos.

2.8.1 Colecta de muestras

La colecta de muestras se llevó a cabo con plantas de la variedad Tempranillo, en un viñedo ubicado en la carretera Tecate-Ensenada, en Ensenada Baja California. Se realizaron tres muestreos el primero el 22 junio, el segundo 15 de agosto y el tercero el 5 septiembre del 2023. Las muestras se tomaron de los tejidos de la planta que mostraban signos y síntomas de enfermedad (Figura 7). Fueron colectadas hojas, tallos y frutos, que luego se trasladaron en bolsas estériles al laboratorio de microbiología para el aislamiento de los microorganismos.

2.8.2 Aislamiento de colonias de hongos

En el laboratorio, se cortó de la porción de la planta con signos de infección y se colocó en cajas de Petri con medio PDA adicionado con ampicilina. Las muestras fueron incubadas a temperaturas de 25 °C por 24

h. Posteriormente, las colonias fueron aisladas y cultivadas por separado.

2.8.2 Selección de aislados

Se seleccionaron aquellas colonias que presentaban abundante micelio gris y una morfología colonial de acuerdo con lo reportado en la bibliografía en la descripción del hongo *B. cinerea* (Choi et al., 2018). Estas colonias fueron separadas para continuar con la observación de las estructuras microscópicas con tinción azul de algodón, para la observación de las preparaciones se utilizó un microscopio compuesto vertical.

2.8.3. Identificación molecular del aislado de *B. cinerea*

El aislado de *B. cinerea* fue cultivado en 250 mL de medio líquido PDB. El inóculo consistió en tapones de micelio de 1 cm de diámetro, que fueron incubados a 25 °C, 130 rpm por 5 días. Posteriormente, la biomasa fue separada por filtración con un embudo cubierto de fibra sintética. La biomasa se lavó dos veces con agua destilada estéril y luego fue distribuida en una hoja de aluminio, de manera que se formara una capa delgada y se llevó al ultracongelador a – 80 °C por 12 h. Posteriormente, se realizó la extracción de DNA con el Kit DNA Plant Tissue QIAGEN. Luego, se realizó la amplificación por PCR del gen del factor de elongación 1 alpha (EF-1 α), en la cual se utilizaron los cebadores ef1 (5´-ATG GGT AAG GAR GAC AAG AC-3´) y el ef2 (5´-GGA RGT ACC AGT RAT CAT GTT-3´) (Du et al., 2012). El amplicon fue purificado y enviado a secuenciación a Eton bioscience.

2.8.4 Determinación de la inhibición del crecimiento del aislado de *B. cinerea*

Se comparó la inhibición del aislado de *B. cinerea* de la cepa de referencia *B. cinerea* CDBBH1566. Para ello, se adiciono la formulación de nanopartículas al medio de cultivo PDA a concentraciones de 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente se llevó a cabo la inoculación de las placas con tapones de micelio de 5 mm de diámetro, los cuales fueron colocados en el centro de cada placa, incubados a 25 °C y los resultados se revisaron cada 24 h. En todos los casos se realizó cada ensayo por triplicado y el control consistió en medio de cultivo sin la adición de los tratamientos. El experimento terminó cuando la colonia control del fitopatógeno llenó por completo la caja y para el cálculo del porcentaje de inhibición se utilizó la ecuación 2 presentada previamente.

2.8.5 Comparación de la actividad antifúngica *in vitro* de las nanopartículas de óxido de cobre vs fungicidas comerciales en el aislado de *B. cinerea*

Para llevar a cabo la comparación de la actividad antifúngica *in vitro* de la formulación TGD15 y el fungicida comercial Nordox 75W, se realizaron ensayos con medio envenenado. Se prepararon cajas de 50 mm de diámetro con medio de cultivo PDA a las que se les adicionaron los tratamientos a las concentraciones presentadas en la Tabla 2.

Como fue previamente descrito, las placas fueron inoculadas con tapones de micelio de 5 mm de diámetro, colocados en el centro de cada placa, posteriormente se incubaron a 25 °C, y se observaron cada 24 h. En todos los casos se realizó cada ensayo por triplicado, como control se utilizó el crecimiento del hongo en medio de cultivo sin la adición de los tratamientos. El experimento concluyó cuando la colonia del fitopatógeno llenó por completo la caja del control, y nuevamente para el cálculo del porcentaje de inhibición se utilizó la ecuación 2.

Tabla 2. Concentración de tratamientos antifúngicos a comparar.

Tratamiento	Concentración de CuO (µg/mL)
TGD15	170
Nordox 75W	170
	1350

2.9 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), y cuando las diferencias generales fueron significativas ($p > 0.05$), se utilizó la prueba de Tukey para comparar los valores medios entre los tratamientos individuales. Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significancia de 0.05. El análisis de resultados se realizó utilizando librerías de lenguaje de programación Python.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Ensayos de confrontación en placa

Los resultados mostraron actividad antagonista en todas las cepas de *Trichoderma* (Figura 8). Se observó mayor porcentaje de inhibición por parte de *T. ghanense* C4B con un valor del 58%, seguido por *T. atroviridae* con un 55%, *T. harzianum* C4A con 45% y *T. asperellum* T8A con 34% (Figura 9).

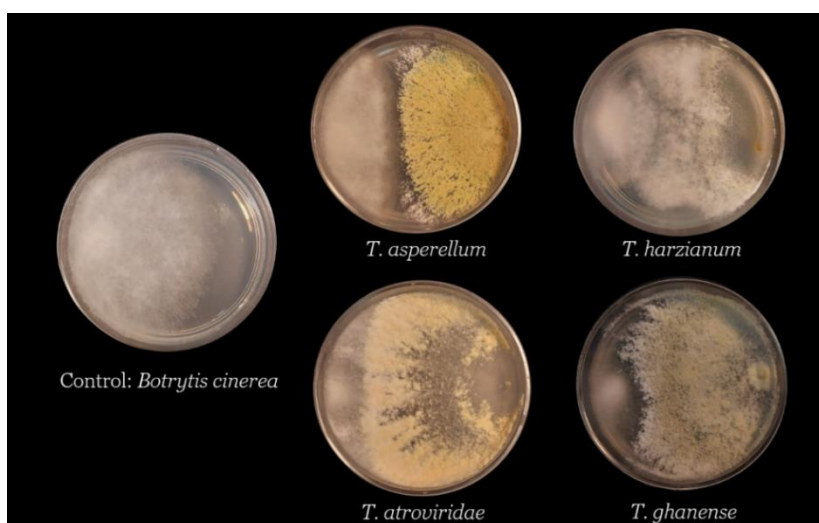


Figura 8. Cocultivo de *B. cinerea* CDBBH1556 con diferentes cepas de *Trichoderma*.

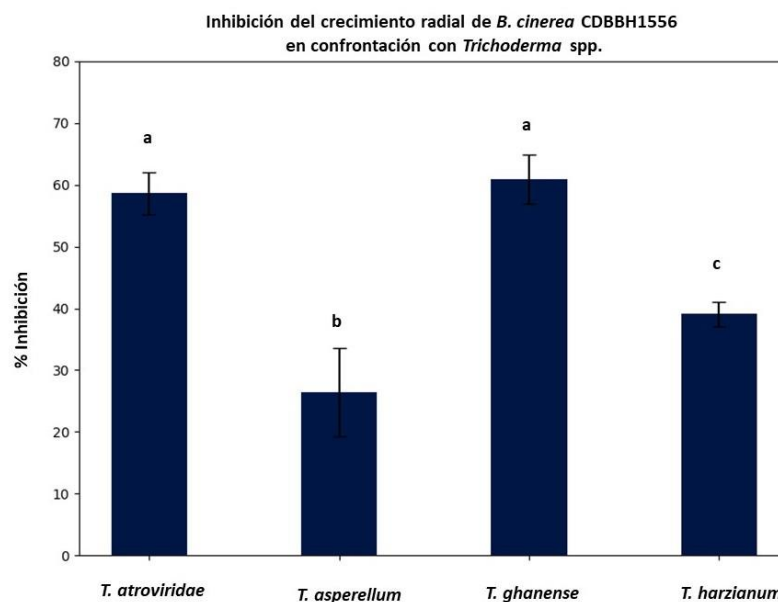


Figura 9. Porcentaje de inhibición de *B. cinerea* CDBBH1556 en cocultivo con diferentes especies de *Trichoderma*. Los resultados son la media \pm SD (n=3), *p < 0.000 (ANOVA de una vía con un test de Tukey).

3.2 Elección del sobrenadante a utilizar en la biosíntesis de CuONPs

Para la elección del sobrenadante a utilizar en la biosíntesis de las CuONPs, se realizó un ensayo en medio envenenado con los sobrenadantes S1 y S2 de las cuatro cepas de *Trichoderma*. Los resultados se presentan en la Figura 10. En el caso de los tratamientos con el SN1, se observó muy baja actividad inhibitoria sobre el crecimiento radial del micelio de *B. cinerea* CDBBH1556 con respecto al control.

En contraste, los resultados obtenidos con los SN2 indican que el SN2 de *T. ghanense* C4B mostró 73.61% de inhibición del crecimiento radial del micelio del fitopatógeno, seguido por el SN2 de *T. asperellum* T8A que mostró un porcentaje de inhibición del 41.66%, mientras que *T. atroviridae* alcanzó un 9.72% de inhibición, y *T. harzianum* C4A un 6.94% (Figura 10).

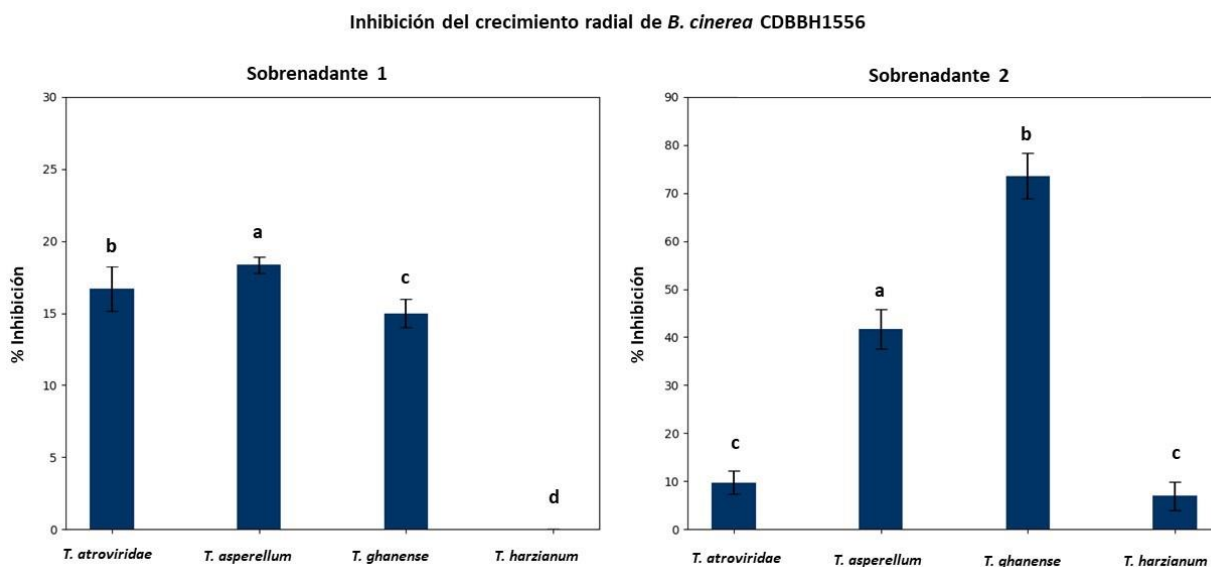


Figura 8. Inhibición del crecimiento de *B. cinerea* CDBBH1556. Los resultados son la media \pm SD (n=3). A) Sobrenadante 1 *p <0.000. B) Sobrenadante 2 *p <0.000 (ANOVA de una vía con un test de Tukey).

3.3 Biosíntesis de CuONPs

Para la biosíntesis de las CuONPs, se eligieron las especies de *Trichoderma* con mejor actividad inhibitoria de acuerdo con los ensayos en medio envenenado con sobrenadantes 1 y 2. Estas fueron *T. ghanense* C4B y *T. asperellum* T8A. Se realizaron un total de 36 experimentos de reacción (Tabla 3), la formación de las nanopartículas se confirmó con el cambio de viraje de un color amarillo claro a un azul y se eligieron las formulaciones que presentaron estabilidad después de 24 h (Tabla 4).

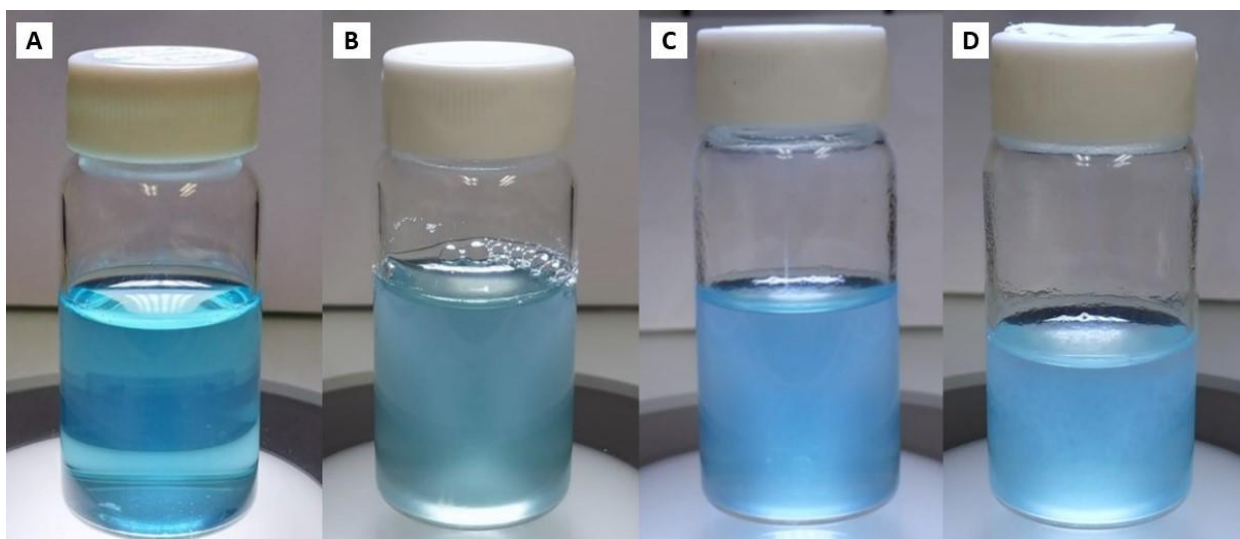
Tabla 3. Viraje de los experimentos de síntesis.

Experimentos de síntesis		
Número	Clave de identificación	Color de la reacción
1	1-TGP10	azul
2	2-TGP15	azul
3	3-TGP10	amarillo
4	4-TGP15	amarillo
5	5-TGD10	café
6	6-TGD15	café
7	7-TGD10	café
8	8-TGD15	café
9	9-TAP10	azul
10	10-TAP15	azul
11	11-TAP10	verde
12	12-TAP15	verde
13	13-TAD10	verde
14	14-TAD15	azul
15	15-TAD10	café
16	16-TAD15	café
17	17-TGP20	azul
18	18-TGP30	azul
19	19-TGP20	amarillo
20	20-TGP30	verde
21	21-TGD20	café
22	22-TGD30	café
23	23-TGD20	café
24	24-TGD30	café
25	25-TAP20	azul
26	26-TAP30	azul
27	27-TAP20	azul
28	28-TAP30	azul
29	29-TAP20	café
30	30-TAP30	café
31	31-TAP20	café
32	32-TAP30	café
33	33-TGD15	azul
34	34-TGD30	azul-celeste
35	35-TAD15	azul
36	36-TAD30	azul-celeste

Tabla 4. Formulaciones de CuONPs seleccionadas.

Clave de identificación	Sobrenadante	Concentración de la sal precursora	Temperatura de reacción	pH
TGP15	SN 1 <i>T. ghanense</i>	15 mM	24 °C	10
TAP15	SN 1 <i>T. asperellum</i>	15 mM	24 °C	10
TGD15	SN 2 <i>T. ghanense</i>	15 mM	24 °C	8
TAD15	SN 2 <i>T. asperellum</i>	15 mM	24 °C	8

Las formulaciones seleccionadas se presentan en la Figura 11. En la TGP15 (Figura 11 A) y TAP15 (Figura 11 B) no se observó formación de precipitado, mientras que en la TAD15 (Figura 11 C) y TGD15 (Figura 11 D) si fue observada la formación de un precipitado azul. Se determinó que la concentración de CuO presente en las formulaciones fue de 0.39775 mg/ mL.

**Figura 9.** CuONPs sintetizadas. A. TGP15, B. TAP15, C. TGD15, D. TAD15.

3.4 Caracterización de las CuONPs

Los resultados de la caracterización de las nanopartículas a través de las diferentes técnicas se presentan a continuación para cada una de las formulaciones: TAP15, TAD15, TGP15 y TGD15.

3.4.1 Formulación TAP15

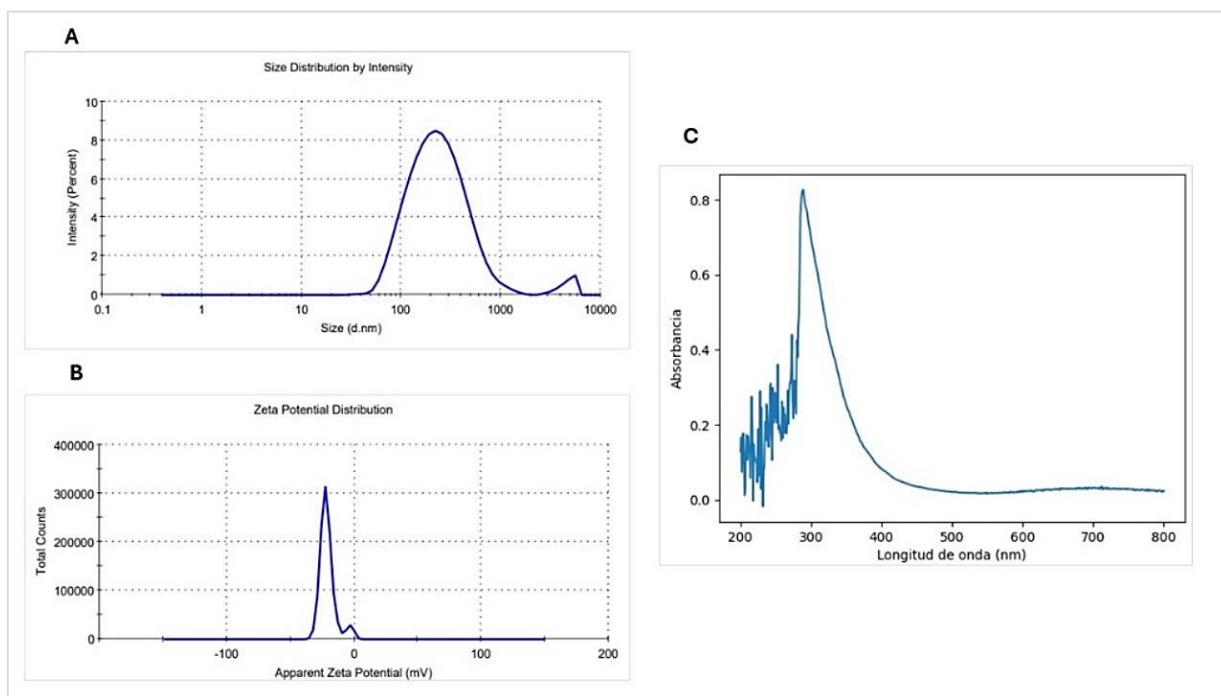


Figura 11. Caracterización de CuONPs formulación TAP15, A. Determinación del diámetro hidrodinámico, B. Determinación de potencial Z, C. Curva de absorbancia UV-Vis.

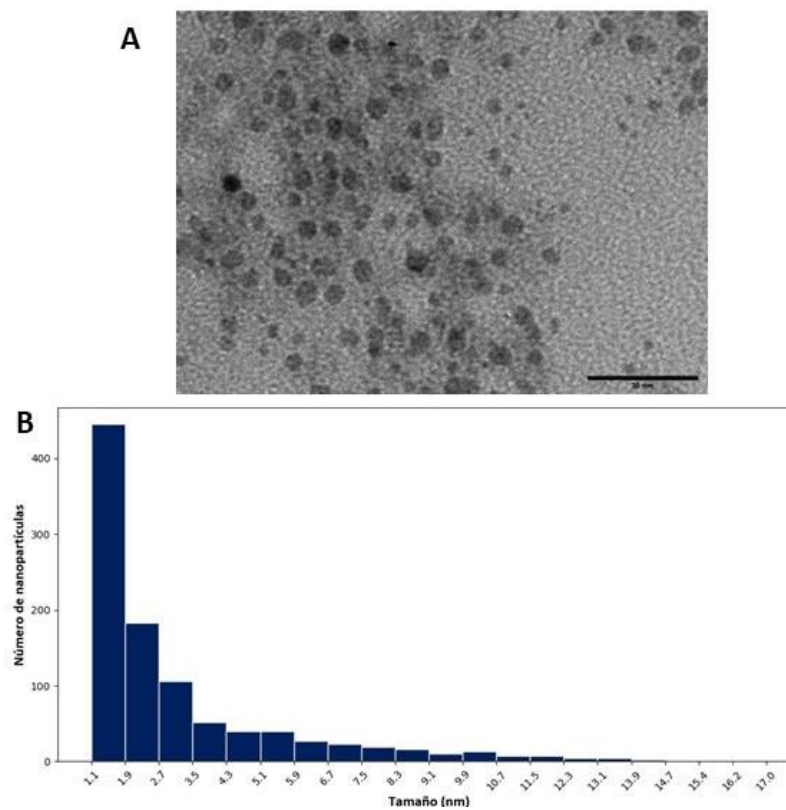


Figura 10. A. Micrografía de las CuONPs- TAP15. B. Histograma de tamaño de las nanopartículas. n: 1000.

El valor de absorbancia de la formulación TAP15 fue de 286 nm en espectroscopía UV- visible (Figura 12 C), lo que coincide con el valor esperado para la formación de CuONPs. El tamaño hidrodinámico fue de 215.4 nm y la carga superficial (potencial Z) fue de -26.6 Mv (Figura 12 A y B). Las nanopartículas se analizaron por TEM para examinar su forma y tamaño (Figura 13). Se midieron un total de 1000 nanopartículas y se encontraron nanopartículas con una forma cuasi esférica con tamaños de entre 1 y 14.7 nm, la mayoría con un tamaño dentro de un rango de 1 a 3 nm.

3.4.2 Formulación TAD15

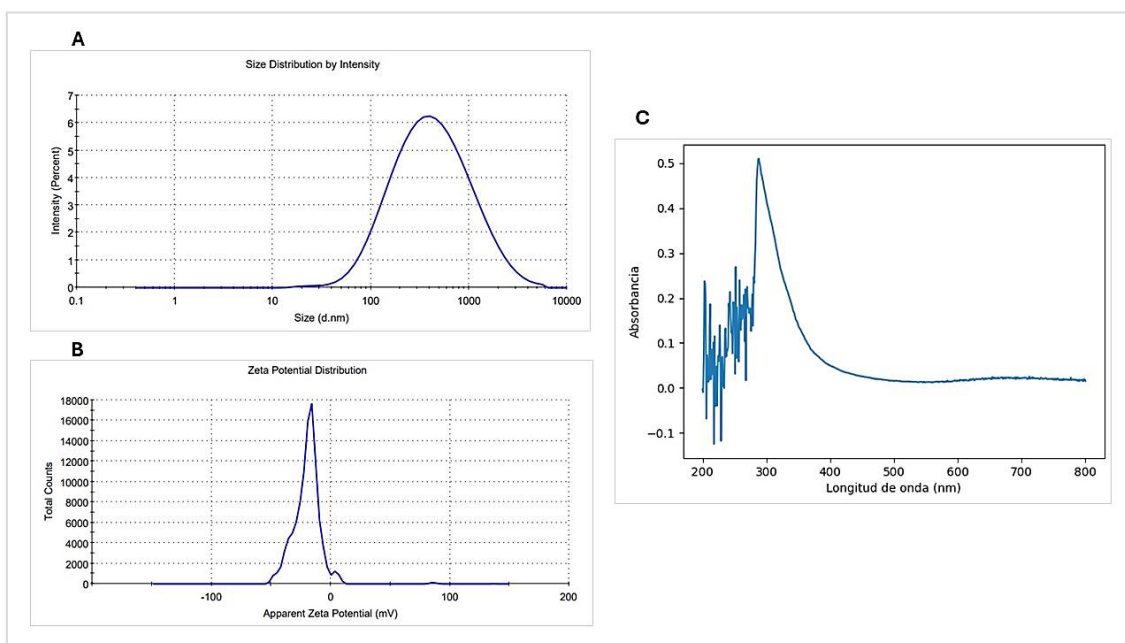


Figura 12. Caracterización de CuONPs formulación TAD15, A. Determinación del diámetro hidrodinámico, B. Determinación del potencial Z, C. Curva de absorbancia UV-Vis.

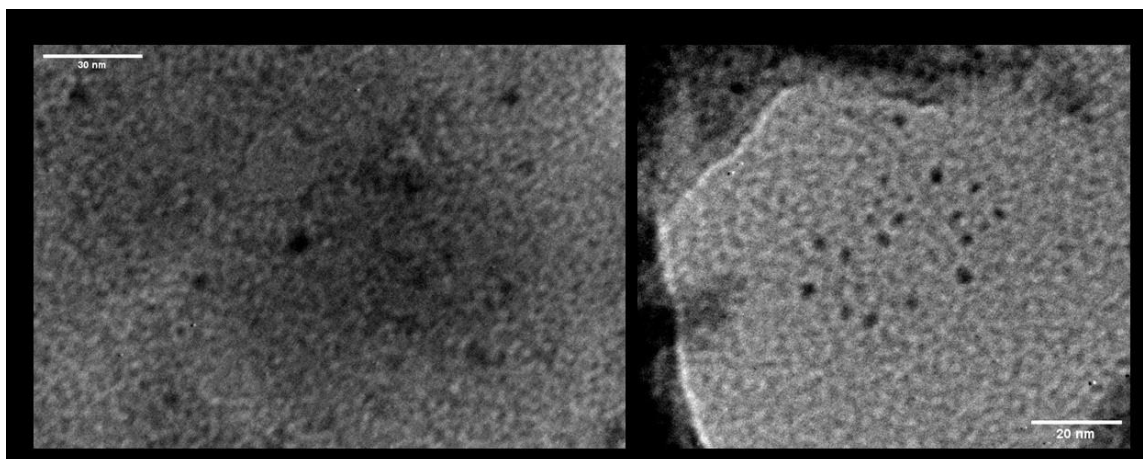


Figura 13. Micrografía de las CuONPs TAD 15.

Las nanopartículas de la formulación TAD 15 presentaron un valor de absorbancia de 288 nm en espectroscopía UV- visible (Figura 14 C), mientras que el tamaño hidrodinámico de la CuONPs fue de 298.7 nm y la carga superficial (potencial Z) fue de -19.2 Mv (Figura 14 A y B). En el análisis por TEM (Figura 15), se observaron pocas nanopartículas. Se determinó que se tratan de nanopartículas cuasi esféricas con tamaños de entre 1 y 5 nm. No se contó un número suficiente de nanopartículas para realizar el histograma de tamaño.

3.4.3 Formulación TGP15

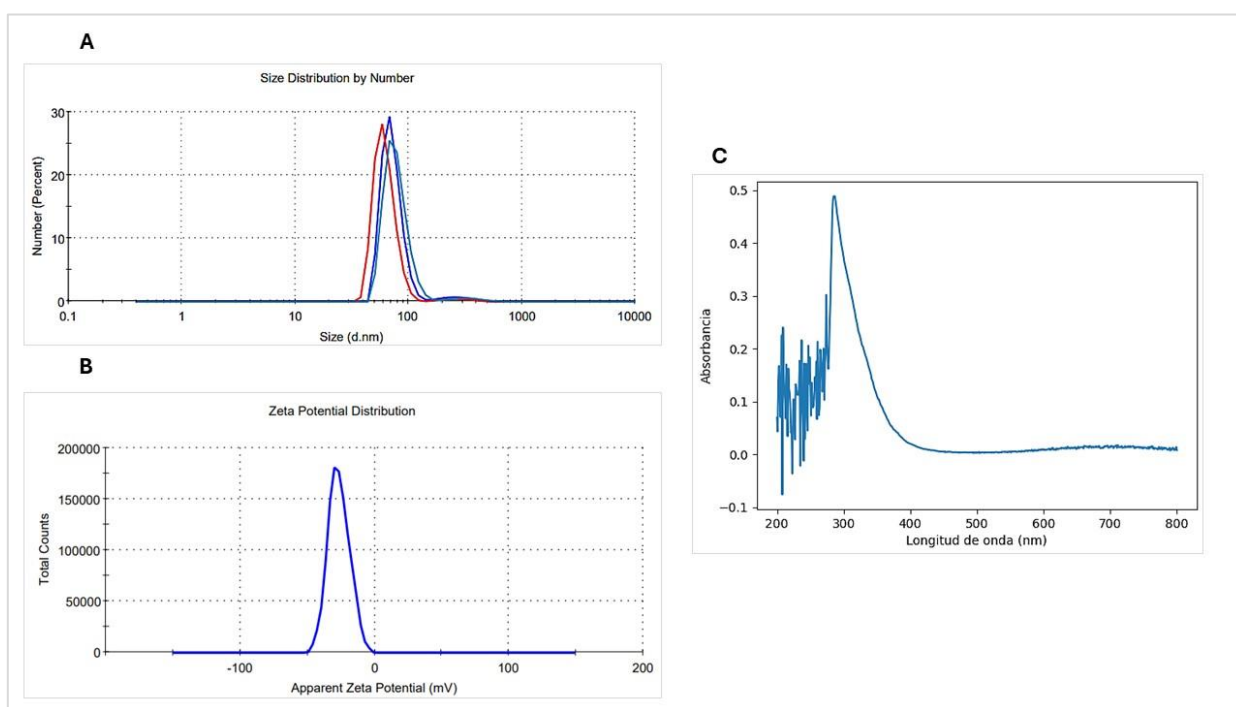


Figura 14. Caracterización de CuONPs formulación TGP15. A. Determinación del diámetro hidrodinámico, B. Determinación del potencial Z, C. Curva de absorbancia UV-Vis.

En la caracterización de la formulación TGP15 se determinó un valor de absorbancia de 286 nm en espectroscopía UV- visible (Figura 16 C). El tamaño hidrodinámico de las CuONPs fue de 215.4 nm y el potencial Z fue de -26.6 Mv (Figura 16 A y B).

En el análisis por TEM se encontraron nanopartículas con una forma cuasi esférica (Figura 17 A). Se midieron un total de 1000 nanopartículas y se determinó que la mayoría se encontraba en un tamaño dentro de un rango de entre 1 a 2.9 nm (Figura 17 B).

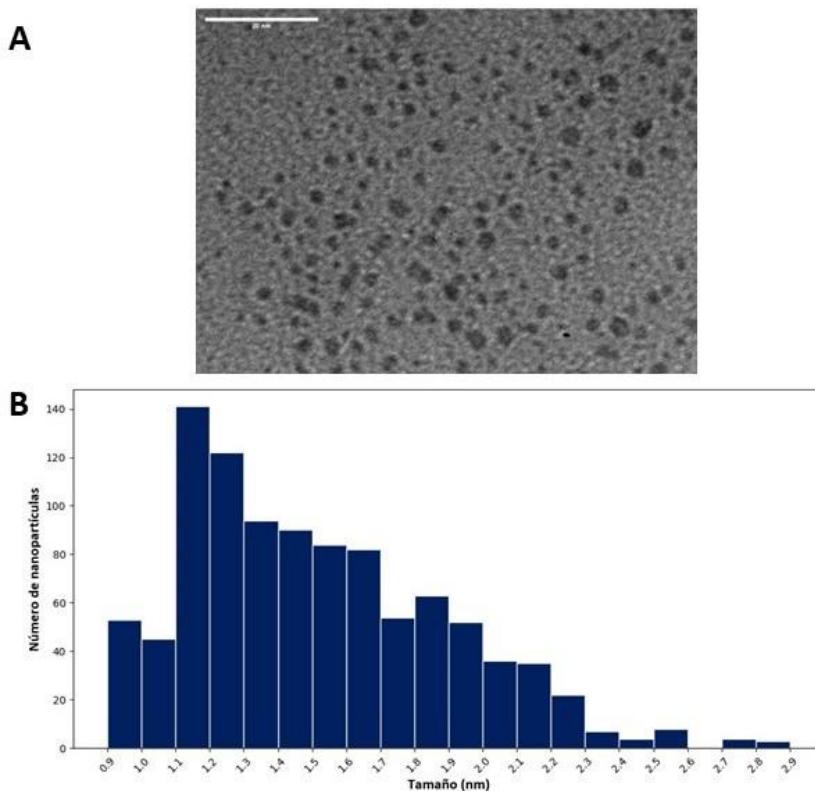


Figura 16. A. Micrografía de las CuONPs TGP15. B. Histograma de tamaño de las nanopartículas. n: 1000.

3.4.4 Formulación TGD15

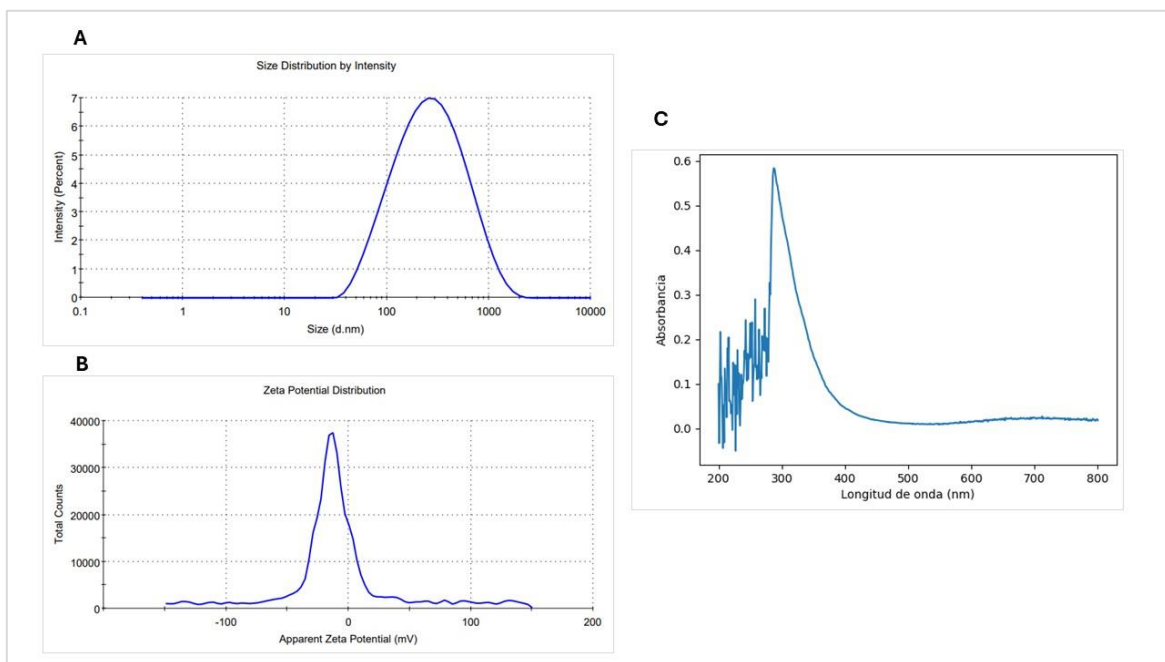


Figura 15. Caracterización de CuONPs formulación TGD15, A. Determinación del diámetro hidrodinámico, B. Determinación del potencial Z, C. Absorbancia UV-Vis.

Las nanopartículas de la formulación TGD15 mostraron un valor de absorbancia de 288 nm en espectroscopía UV- visible (Figura 18 C) característico de la formación de nanopartículas de óxido de cobre. El tamaño hidrodinámico de la CuONP fue de 193. 4 nm y el potencial Z fue de -7.88 Mv (Figura 18 A y B). Los resultados del análisis por TEM de las nanopartículas, se presenta en la Figura 19. Para este análisis se midieron un total de 1000 nanopartículas, y se encontraron formas cuasi esféricas con tamaños de 1 a 2.7 nm.

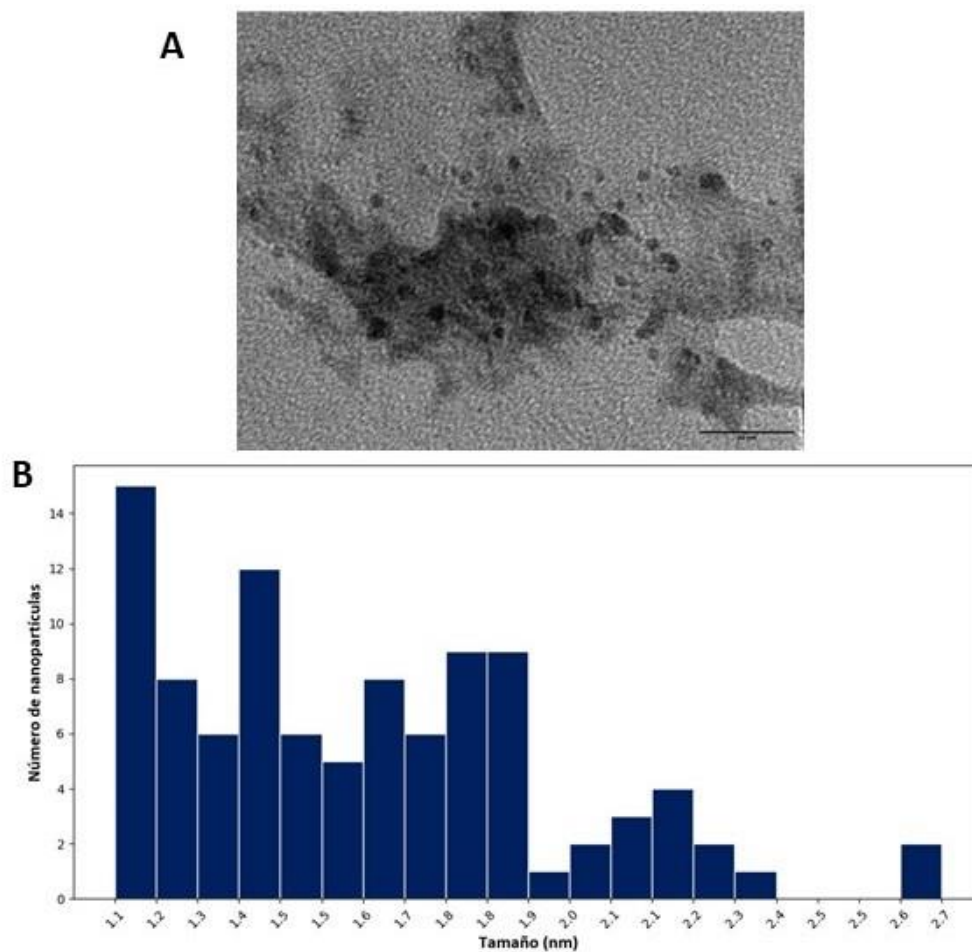


Figura 17. A. Micrografía de las CuONPs TGD15. B. Histograma de tamaño de las nanopartículas. n: 1000.

3.5 Actividad antifúngica de las CuONPs frente a *B. cinerea* CDBBH1556

Los resultados de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se presentan en la Tabla 5. Los tratamientos con TAP15, TAD15, TGP15 lograron inhibir el crecimiento radial de la colonia de *B. cinerea* CDBBH1556 con una adición de 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que la formulación TGD15 requirió una concentración del 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de adición.

Tabla 5. Determinación de la CMI de las formulaciones de CuONPs.

% Inhibición del crecimiento radial del micelio					
Tratamiento adicionado	130 $\mu\text{g/mL}$	140 $\mu\text{g/mL}$	150 $\mu\text{g/mL}$	160 $\mu\text{g/mL}$	170 $\mu\text{g/mL}$
TAP 15	11.66 \pm 7.6	16.6 \pm 5.77	40 \pm 8.6	66.6 \pm 7.6	96.66 \pm 5.770
TAD 15	63.3 \pm 5.7	60 \pm 10	81.6 \pm 10.4	91.6 \pm 7.6	98.33 \pm 2.88
TGP 15	41.66 \pm	58.33 \pm 7.6	46.6 \pm 7.6	73.33 \pm 2.88	98.33 \pm 2.88
TGD 15	76.6 \pm 5.7	75 \pm 5	90 \pm 8.6	100 \pm 0	-

En la Figura 20 se presentan los resultados de la determinación de la actividad inhibitoria del crecimiento radial de las cuatro formulaciones de CuONPs, los sobrenadantes y la sal precursora a la misma concentración. Es decir, 160 $\mu\text{g/mL}$ de CuONPs y sal precursora ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), lo que corresponde a una adición del 40% de los sobrenadantes. Se muestran diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Figura 20). El sobrenadante que presentó mayor actividad fue el SNTGD (SN2 *T. ghanense*) con un 86.66%. Sin embargo, no logró inhibir completamente el crecimiento del fitopatógeno como ocurrió con la formulación de CuONPs TGD15 (100%). La sal precursora logró una inhibición del 8.33%. En todos los tratamientos se observó inhibición del crecimiento radial con respecto al control (Figura 21).

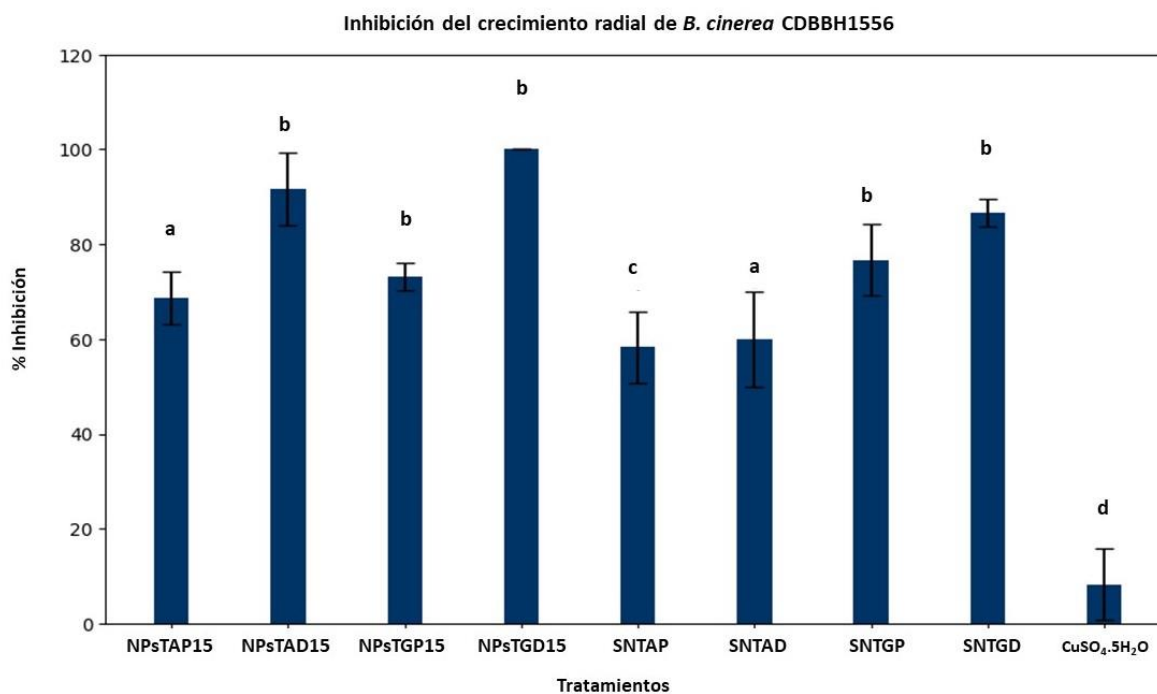


Figura 18. Inhibición del crecimiento de *B. cinerea* CDBBH1556 con los diferentes tratamientos a la misma concentración. Los resultados son la media \pm SD (n=3). *p < 0.000(ANOVA de una vía con un test de Tukey).

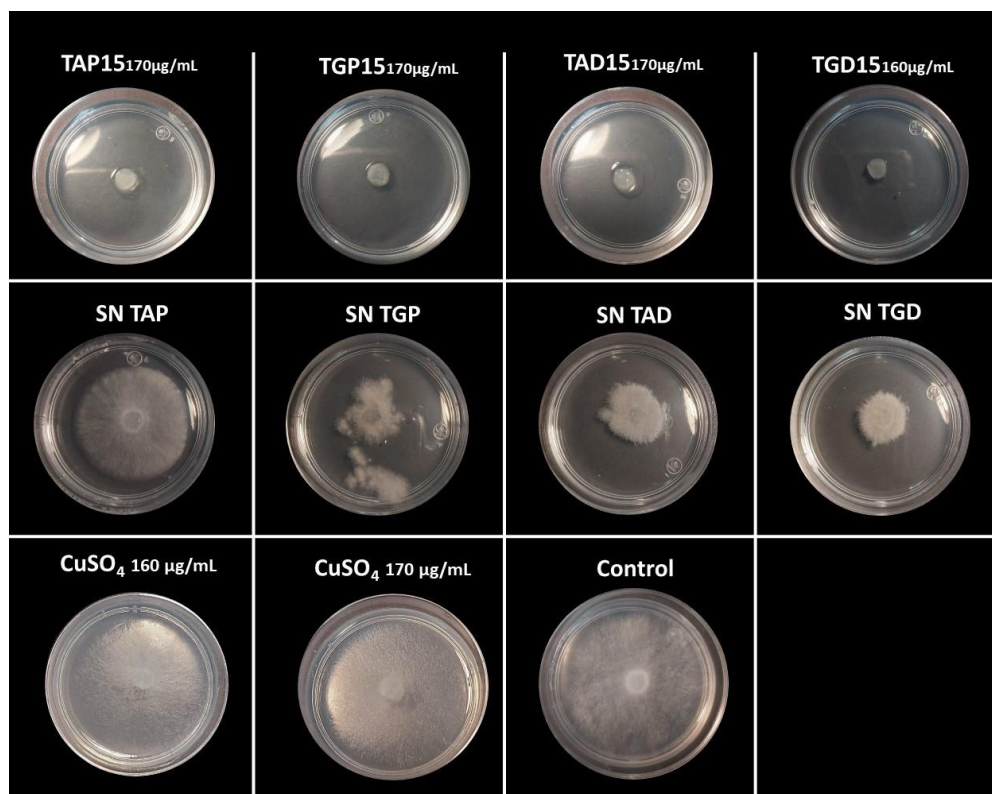


Figura 19. Ensayo en medio envenenado. Crecimiento radial de la colonia de *B. cinerea* CDBBH1556 en diferentes tratamientos. TAP15, TGP15 y TAD15.

3.6 Actividad antifúngica de las CuONP frente a *B. cinerea* aislada de campo

3.6.1 Aislamiento de *B. cinerea* en campo

Se aislaron un total de 113 hongos con morfología colonial diferente, de los cuales 42 provienen de muestras de hojas, 40 de tallo y 31 de frutos (Tabla 6). Con base en la observación de las características de la morfología colonial, se seleccionaron los hongos que presentaron mayor similitud a la especie *B. cinerea*.

Tabla 6. Recuento de aislados obtenidos en los tres muestreos realizados.

Muestreo	Hoja	Tallo	Fruto
Primer muestreo	17	21	8
Segundo muestreo	14	4	18
Tercer muestreo	11	15	5
Total	42	40	31

3.6.2 Identificación del aislado sospechoso de *B. cinerea*

El hongo identificado con la clave M3-H13, que corresponde a un hongo aislado de hoja en el muestreo 3, presentó una morfología colonial característica. Micelio blanco grisáceo (Figura 22 A), que con el paso del tiempo se fue tornando oscuro y presentó formación de esclerocios (Figura 22 B). Al observar preparaciones al microscopio se observaron estructuras como conidióforos largos y ramificados con racimos de conidios (Figura 23 A y B) y los conidios presentaban una forma ovoide característica (Figura 23 C).

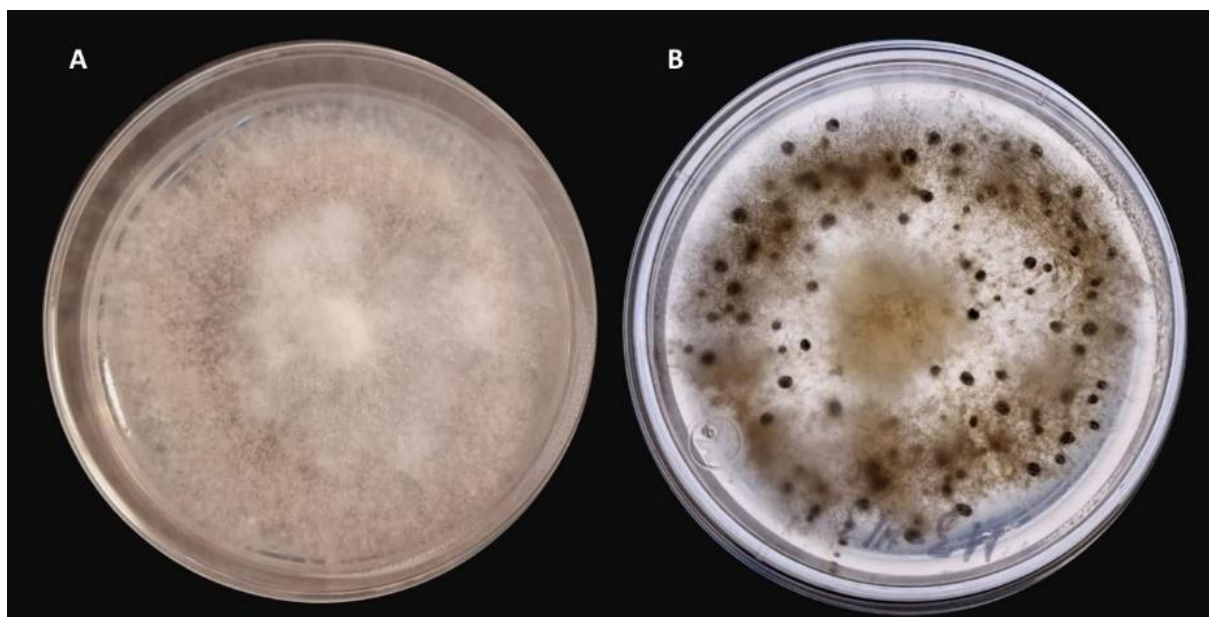


Figura 20. Características de la morfología colonial del aislado H13 en medio de cultivo PDA. A. Crecimiento a los 7 días, B. Crecimiento pasados 15 días.

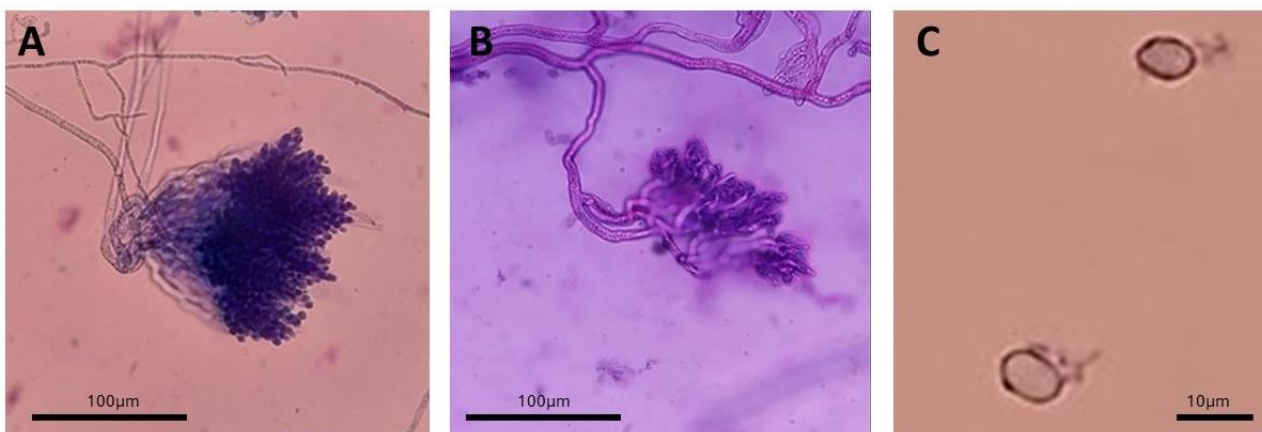


Figura 21. Estructuras microscópicas del aislado H13 observadas con un microscopio compuesto vertical. A. y B. Conidióforos ramificados. C. Conidios ovoides.

3.6.3 Identificación molecular del aislado sospechoso de *B. cinerea*

El análisis Blast de la región EEF-1 α del hongo H13, muestra una homología con *B. cinerea* (DQ471057) con un E valor de 7×10^{-68} , 88.44% de identidad y 43% de cobertura. En relación con los datos de Bootstrap el aislado de *B. cinerea* presentó un soporte del 100% con *B. cinerea* AFTOL-ID59 (DQ471045.2) (Figura 24).

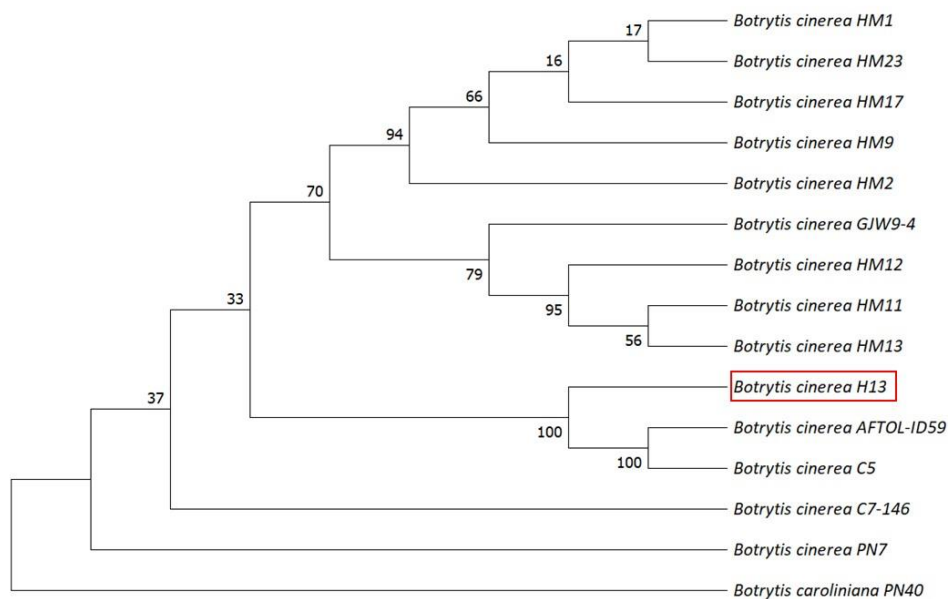


Figura 22. Árbol filogenético de la región basado en el método de máxima similitud, con valores de bootstrap expresados en porcentaje. *B. caroliniana* fue utilizado como grupo externo.

3.6.4 Inhibición del crecimiento radial del aislado de *B. cinerea*

En la Figura 25, se muestra el crecimiento radial del aislado de campo de *B. cinerea* cuando es sometido a los diferentes tratamientos. Los resultados de la determinación de la inhibición del crecimiento se presentan en la Figura 26, se observan diferencias significativas de los tratamientos con nanopartículas con respecto a los tratamientos con el sobrenadante y la sal precursora.

Se determinó una CMI de 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nuevamente, la formulación TGD15 presentó mejores resultados con un 98.33 % de inhibición, seguido de la TAD15 que logró el 95% de inhibición, TGP15 el 91.66 %, TAP15 un 81.66 %. Los sobrenadantes que presentaron mejor actividad inhibitoria fueron el TGP y el TGD con 71.66 % y 93.33 % respectivamente. La sal precursora inhibió un 6.66% del crecimiento micelial.

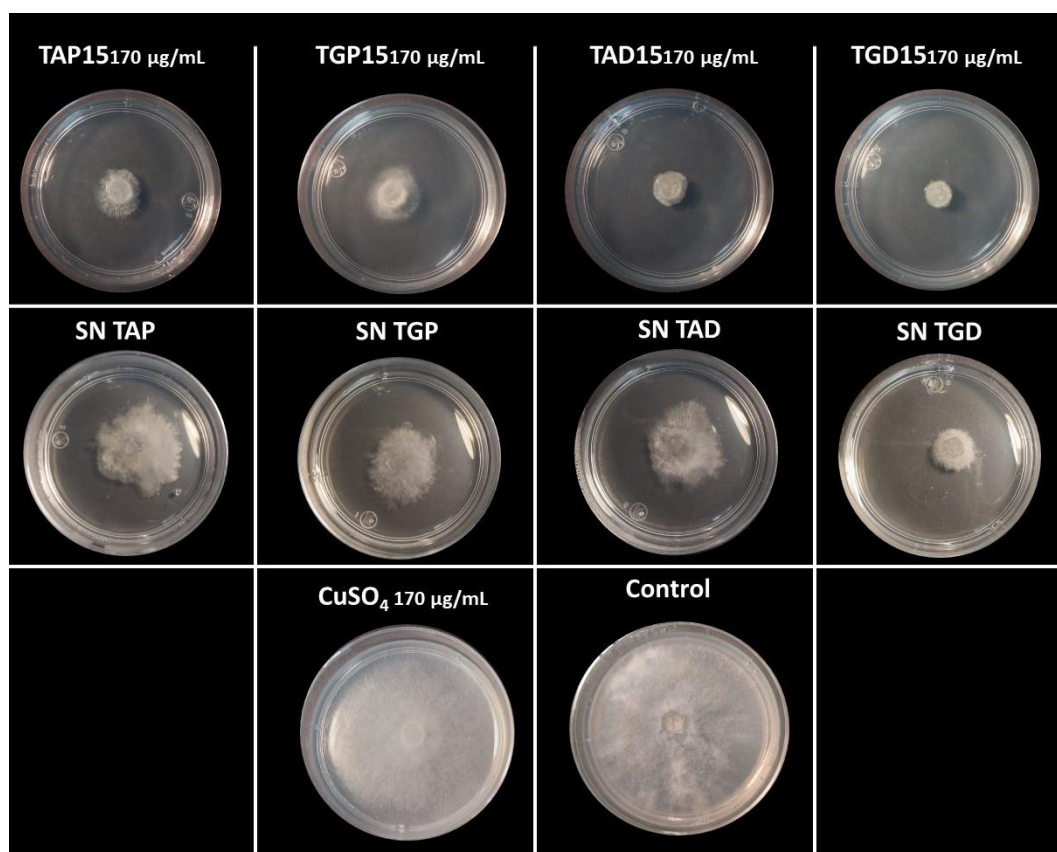


Figura 24. Inhibición del crecimiento de *B. cinerea* aislado de campo con los diferentes tratamientos.

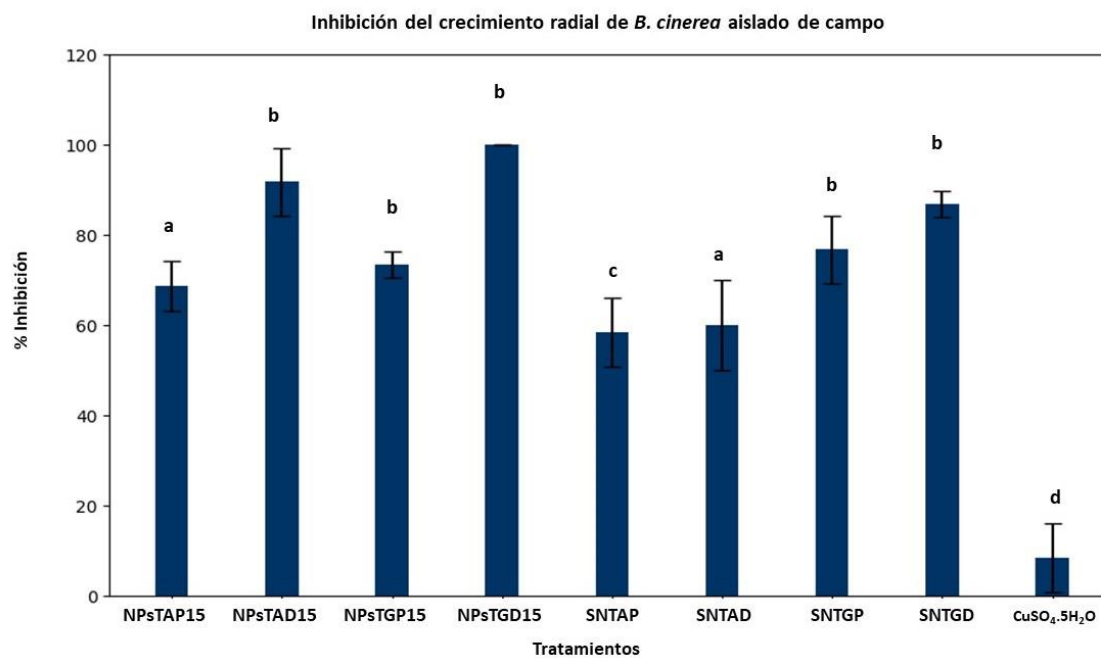


Figura 23. Inhibición del crecimiento de *B. cinerea* aislado de campo con los diferentes tratamientos con la misma concentración de adición al medio: 42%. Los resultados son la media \pm SD (n=3). *p < 0.000 (ANOVA de una vía con un test de Tukey).

3.7 Comparación de la actividad antifúngica *in vitro* de las nanopartículas de óxido de cobre vs fungicida comercial en el aislado de *B. cinerea*

Los resultados presentados en la Tabla 7, muestran que a la concentración de 170 $\mu\text{g/mL}$ la formulación de nanopartículas puede inhibir en su totalidad el crecimiento del aislado de campo de *B. cinerea* (98.33%). Mientras que un fungicida comercial con el mismo principio activo no causó inhibición del crecimiento radial del hongo con respecto al control. Al probar la concentración indicada por el producto tampoco se observó inhibición del crecimiento radial (Figura 27).

Tabla 7. Actividad antifúngica de CuONPs y un fungicida comercial.

Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	%Inhibición del crecimiento radial
TGD 15	170	100 \pm 0
Nordox 75W (Óxido cuproso)	170	0 \pm 0
	1350	0 \pm 0

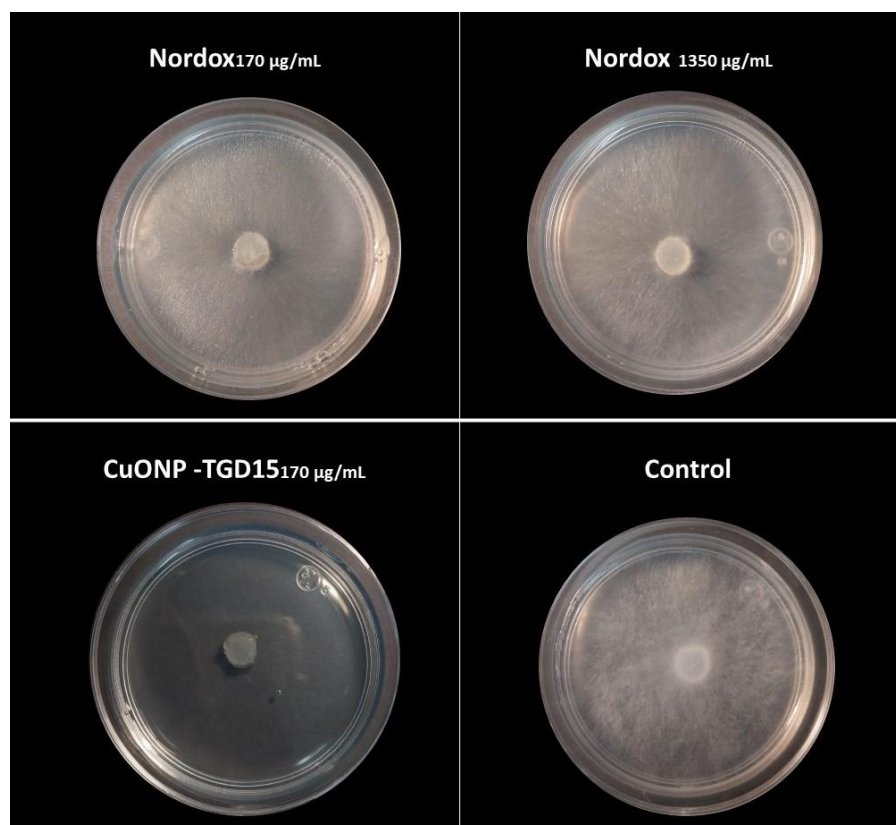


Figura 25. Ensayo en medio envenenado. Se probó la actividad antifúngica de CuONPs TGD15 y un fungicida comercial frente al aislado de *B. cinerea*.

Capítulo 4. Discusión

La capacidad del género *Trichoderma* para controlar enfermedades causadas por diferentes microorganismos fitopatógenos se ha relacionado con diferentes mecanismos tales, como competencia por nutrientes, micoparásitismo, producción de antibióticos, producción de enzimas líticas, y la promoción del sistema de defensa en las plantas (Guzmán-Guzmán et al., 2023; Stracquadanio et al., 2020). Las especies de este género han demostrado buenos resultados inhibiendo el desarrollo de diversos hongos fitopatógenos, como *A. alternata*, *F. proliferatum*, *B. sorokiniana*, *D. halodes* y *E. turcicum*, por mencionar algunos (Ma et al., 2023; Mukhopadhyay & Kumar, 2020; Sánchez-Montesinos et al., 2021; Yassin et al., 2022).

En este trabajo, primero se realizó un ensayo de cocultivo en placa con cuatro cepas de *Trichoderma*, para determinar su actividad antagonista frente al fitopatógeno *B. cinerea*. Los resultados mostraron diferencias significativas en el comportamiento antagónico, donde las cepas probadas, *T. ghanense* y *T. atroviridae* presentaron el mayor porcentaje de inhibición sin mostrar diferencias significativas entre ambas. Por un lado, *T. ghanense* C4B presentó el valor más alto de inhibición con un 58%, similar a los reportado por Khadka y colaboradores (2022), quienes también observaron inhibición del crecimiento micelial de *R. solani*. En estudios recientes se informó un porcentaje de inhibición del 44% cuando se enfrentó en cocultivo con *P. aphanidermatum* (Al-Shuaibi et al., 2024).

Por otro lado, *T. atroviridae* ha mostrado una alta eficacia en la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* contra fitopatógenos como *C. acutatum* (100%), *F. oxysporum* (56.7%) y *P. capsici* (63.3%), según lo reportado en el estudio de Kim et al. (2023). Mientras que, en este trabajo se encontró que *T. atroviridae* inhibió el crecimiento de *B. cinerea* CDBBH1556 en un 55%.

La cepa de *T. harzianum* C4A presentó un 45% de inhibición frente a *B. cinerea* CDBBH1556, este resultado es menor a lo reportado previamente por Geng et al. (2022) quienes observaron un 62% de inhibición en un ensayo en placa de *T. harzianum* frente a un aislado de *B. cinerea* aislado de plantas de tomate. De manera similar, *T. asperellum* T8A logró inhibir el crecimiento de *B. cinerea* en un 34%, un porcentaje bajo en comparación al 74.24% reportado por Kuzmanovska (2018) en un estudio en el que se evaluó la actividad *in vitro* de *T. asperellum* frente a 18 diferentes aislados de *B. cinerea*.

Para aprovechar el amplio espectro de metabolitos secundarios y enzimas que produce *Trichoderma*, se realizó el cultivo en medio líquido de cada una de las cepas utilizadas en este trabajo, se obtuvieron dos

sobrenadantes diferentes: el sobrenadante 1 (SN1) del cultivo en PDB y el sobrenadante 2 (SN 2) del cultivo en agua desionizada. En el ensayo de medio envenenado, mostraron diferencias en cuanto al potencial inhibitorio del crecimiento de la cepa de *B. cinerea* CDBBH1556. Los mejores resultados fueron obtenidos con los SN2 de las cepas *T. ghanense* C4B con un 73.61% de inhibición y *T. asperellum* T8a con un 41.66%.

Hasta la fecha, no se han realizado estudios sobre la actividad inhibitoria *in vitro* del sobrenadante de *T. ghanense* contra *B. cinerea*. Este trabajo representa el primer informe que documenta el notable potencial inhibitorio de *T. ghanense* frente al crecimiento micelial de este fitopatógeno. En contraste, *T. asperellum* es una de las especies más estudiadas del género y su sobrenadante ya había mostrado buenos resultados frente al crecimiento de fitopatógenos. Un estudio realizado por González y colaboradores (2024) reportó que los metabolitos secundarios contenidos en el extracto crudo de este hongo poseen una evidente actividad fungistática frente a *B. cinerea*. De manera similar, otro estudio realizado por Elshahawy & Marrez (2024), informó un alto efecto del sobrenadante en la inhibición del crecimiento de cepas de *Fusarium solani*. Además, el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) del sobrenadante libre de células y de la biomasa micelial indicó que los principales compuestos responsables de la bioactividad fueron hidroxitolueno butilado, ácido hexadecanoico, ácido 9-octadecenoico, ergosterol y éster etílico del ácido hexadecanoico (Elshahawy & Marrez, 2024).

Diversos estudios sugieren que la actividad inhibitoria del sobrenadante de las especies de *Trichoderma* se debe a la amplia gama de metabolitos secundarios y enzimas líticas que este hongo puede secretar (Tchameni et al., 2020; Song & Ji, 2024). La caracterización de diferentes extractos ha revelado la presencia de alcaloides, lactonas, quinonas, azúcares reductores, flavonoides, triterpenos y esteroides (Agostini et al., 2021), así como la producción de enzimas líticas extracelulares, entre las que se incluyen quitinasas, β -(1,3)-, β -(1,6)- glucanasas y proteasas, que hidrolizan uno de los principales componentes de la célula del hongo patógeno, la pared (Tyśkiewicz et al., 2022).

Para la síntesis de nanopartículas, en este trabajo se eligieron los sobrenadantes de las cepas de *Trichoderma* que presentaron mayor porcentaje de actividad inhibitoria del crecimiento micelial: *T. ghanense* C4B y *T. asperellum* T8a. En el proceso de síntesis, el sobrenadante participa como agente reductor (Hu et al., 2019). Aunque se trata de un protocolo sencillo, los parámetros como temperatura, concentración del precursor metálico, pH y medio de cultivo, pueden resultar en nanopartículas con diferentes características fisicoquímicas (Guilger-Casagrande et al., 2019).

El protocolo de síntesis que se llevó a cabo en este estudio se realizó a temperatura ambiente (24 °C). Se

ha registrado que la temperatura influye en la velocidad de síntesis de nanopartículas. Varios estudios indican que tasas de síntesis más rápidas se logran a temperaturas más altas. Sin embargo, el tamaño y la estabilidad de las nanopartículas puede verse comprometido. En este trabajo, se encontró una buena estabilidad en todas las formulaciones sintetizadas a temperatura ambiente (24 °C), lo que coincide con el estudio de Shahzad et al. (2019) quienes, reportaron nanopartículas de menor tamaño y mayor estabilidad a temperaturas cercanas a los 20 °C.

Otro aspecto importante por considerar fue el pH, ya que la conformación de las enzimas nitrato reductasas pueden verse alteradas de acuerdo con la concentración de protones en el medio de reacción y esto a su vez causa alteración de la morfología y el tamaño de la nanopartícula. En este estudio, la reacción de síntesis se ajustó a un pH alcalino: las síntesis con el SN1 se realizaron a un pH de 10, mientras que las que se realizaron con SN2 fueron a un pH de 8. Esto con base en que algunos estudios sugieren que, a un pH más alto, existe mayor competencia entre los protones y los iones metálicos para establecer enlaces con regiones cargadas negativamente, lo que resulta en un mayor éxito en la síntesis (Cuevas et al., 2015; Sintubin et al., 2009).

El precursor metálico se adicionó a una concentración de 15 mM, para evitar una cantidad excesiva de iones metálicos, ya que se ha reportado que mayores concentraciones pueden causar la formación de nanopartículas muy grandes con morfología irregular, debido a la competencia entre los iones y los componentes en el sobrenadante del hongo (Guilger-Casagrande et al., 2019).

Si bien, el mecanismo de síntesis de nanopartículas mediada por *Trichoderma* aún no se ha dilucidado completamente, la literatura sugiere que este se lleva a cabo por enzimas como las reductasas, que actúan como agentes reductores en la biosíntesis. A ello, se le suman enzimas, proteínas y metabolitos secundarios, que también intervienen en la formación de la capa externa de la nanopartícula, lo que puede aportar actividad biológica y estabilidad a la nanopartícula (Ramírez-Valdespino & Orrantia-Borunda, 2021).

Las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) producidas en las cuatro formulaciones presentaron un tamaño pequeño y una forma cuasi esférica, similar a las nanopartículas de cobre biosintetizadas en el trabajo de Ahmadi-Nouraldin et al., (2022) donde utilizaron el sobrenadante de *T. harzianum*. En cuanto al tamaño, en este trabajo se obtuvieron nanopartículas muy pequeñas en un rango de rango de 1 a 3 nm en la caracterización por TEM, lo que ya se había reportado en otros estudios, (García- Marin et al.,

2022), donde se obtuvieron nanopartículas biosintetizadas con *Trichoderma* sp. con un tamaño promedio de 5.8 nm según la caracterización por TEM.

El tamaño de la nanopartícula es un aspecto que ha sido relacionado a su mecanismo de acción. En algunos estudios se ha descrito que su impacto en hongos puede ocurrir sobre las hifas y las esporas, pues se ha reportado que los hongos tratados con nanopartículas metálicas presentan deformaciones en la hifa, relacionado al daño causado en la pared celular (Slavin & Bach, 2022). Las nanopartículas de menor tamaño pueden ingresar a la célula y causar afectaciones a nivel intracelular, en ello se incluye fragmentación mitocondrial, despolimerización de ribosomas y daño a la cromatina, lo que da lugar a la producción de cuerpos multivesiculares. Además, varios estudios sugieren que la formación de especies reactivas de oxígeno y su acumulación en las células es el mecanismo principal de las nanopartículas en contra de los microorganismos patógenos (Selvaraj et al., 2014; Slavin & Bach, 2022).

En este trabajo, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para las cuatro formulaciones de nanopartículas obtenidas. Los mejores resultados se presentaron con la formulación TGD15, que presentó una CMI de 160 µg/mL para la cepa de *B. cinerea* CDBBH1556, mientras que se requirió una concentración de 170 µg/mL para *B. cinerea* aislada de campo. Son pocos los estudios que han evaluado la exposición de *B. cinerea* a CuONPs biosintetizadas. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo reportado por Parada y colaboradores (2024) quienes reportaron una CMI de 160 µg/ml para lograr la inhibición del fitopatógeno con CuONPs sintéticas. No obstante, en su caso, la naturaleza de las nanopartículas empleadas puede comprometer el equilibrio ambiental y generar efectos nocivos a la salud. Por otro lado, se ha reportado el uso de CuONPs biosintetizadas para inhibir el crecimiento de otros hongos fitopatógenos. Por ejemplo, Gaba et al., (2022) encontraron que las nanopartículas biosintetizadas con el hongo *T. asperellum*, requirieron hasta 200 µg/mL para lograr la inhibición del crecimiento del hongo *A. brassicae*, la misma concentración se informó para inhibir al fitopatógeno *F. solani* (El-Abeid et al., 2024).

La actividad antifúngica de las CuONPs de la formulación TGD15 se comparó en relación con el fungicida comercial Nordox 75W (óxido cuproso) a la concentración en la que se encontró la mayor inhibición del crecimiento micelial en aislado de campo 170 µg/mL. Al comparar con el fungicida, este no causó inhibición a la misma concentración. Curiosamente, al probar la actividad inhibitoria con la concentración de 1350 µg/mL indicado por el producto tampoco se observó inhibición del crecimiento micelial.

Estos resultados muestran evidencia convincente de que la formulación TGD 15 de CuONP es altamente efectiva contra *B. cinerea*, tanto en la cepa de laboratorio como en el aislado de campo. Además, su

efectividad comparable, a la de las nanopartículas sintéticas, junto con su menor impacto ambiental, resalta la ventaja de las nanopartículas biosintetizadas reportadas en este trabajo.

Para llevar a cabo la aplicación práctica y a gran escala de estas nanopartículas en campo, se requiere de estudios para abordar posibles desafíos técnicos y económicos. Como perspectivas a futuro se incluyen, la evaluación de la eficacia a largo plazo de las nanopartículas, estudios detallados sobre su impacto ambiental, que permitan su aplicación en campo y la determinación de los metabolitos presentes en las nanopartículas biosintetizadas.

Finalmente, este estudio demuestra el potencial de los sobrenadantes de las especies de *Trichoderma* para la inhibición del fitopatógeno *Botrytis cinerea*, de forma particular el sobrenadante de *T. ghanense* C4B. Además, el éxito en la síntesis biológica de nanopartículas de CuO a través de los sobrenadantes de *T. ghanense* y *T. asperellum* abre nuevas perspectivas para el desarrollo de formulaciones con actividad antifúngica, que resulten innovadoras y efectivas. La formulación TGD15, mostró mayor eficacia en comparación al resto de las formulaciones obtenidas e incluso frente a un fungicida comercial, lo que permite subrayar su potencial para su aplicación en campo. Los resultados obtenidos en esta tesis amplían el conocimiento acerca de las capacidades biotecnológicas del género *Trichoderma* y al mismo tiempo, sugieren nuevas estrategias sostenibles para el control de enfermedades de plantas.

Capítulo 5. Conclusiones

La obtención de los diferentes sobrenadantes de las cuatro cepas de *Trichoderma* (*T. asperellum* T8A, *T. harzianum* C4A, *T. ghanense* C4B y *T. atroviridae*) reveló diferencias altamente significativas en su capacidad inhibitoria frente al crecimiento de *B. cinerea*. En particular, el sobrenadante 2 de *T. ghanense* C4B mostró un alto porcentaje de inhibición.

La síntesis biológica de CuONPs con los sobrenadantes de *T. ghanense* y *T. asperellum* se logró con éxito. Se obtuvieron nanopartículas pequeñas, cuasi esféricas y estables en un rango de 1 a 3 nm. Los parámetros de síntesis como temperatura, pH y concentración del precursor metálico fueron determinantes de las características fisicoquímicas de las nanopartículas.

La formulación TGD15 mostró una alta efectividad al inhibir el crecimiento de *B. cinerea* CDBBH1556 y el aislado de campo con una CMI de 160 µg/mL y 170 µg/mL, respectivamente. Además, esta formulación mostró mayor eficacia en comparación al fungicida comercial Nordox 75W, el cual no logró inhibir el crecimiento micelial de *B. cinerea* ni en concentraciones más altas. La efectividad de CuONPs biosintetizadas sugiere un alto potencial para su uso en campo como una alternativa eficiente para el control de fitopatógenos.

Literatura citada

- Acosta Morel, W., Anta Fernández, F., Baroncelli, R., Becerra, S., Thon, M. R., van Kan, J. A. L., Díaz-Mínguez, J. M., & Benito, E. P. (2021). A major effect gene controlling development and pathogenicity in *Botrytis cinerea* identified through genetic analysis of natural mycelial non-pathogenic isolates. *Frontiers in Plant Science*, 12, 663870. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.663870>
- Agostini, R. B., Rius, S. P., Vargas, W. A., & Campos-Bermudez, V. A. (2021). Proteome impact on maize silks under the priming state induced by *Trichoderma* root colonization. *Planta*, 253(5), 1–17. <https://doi.org/10.1007/S00425-021-03633-0/FIGURES/9>
- Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology*. (5th ed.) Elsevier Academic Press. [Archivo PDF]
- Ahmadi-Nouraldinwand, F., Afrouz, M., Elias, S. G., & Eslamian, S. (2022). Green synthesis of copper nanoparticles extracted from guar seedling under Cu heavy-metal stress by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Environmental Earth Sciences*, 81(2), 1–10. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-639339/v1>
- Al-Hakkani, M. F. (2020). Biogenic copper nanoparticles and their applications: A review. *SN Applied Sciences*, 2(3), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2279-1>
- Al-Shuaibi, B. K., Kazerooni, E. A., Al-Maqbali, D., Al-Kharousi, M., Al-Yahya'ei, M. N., Hussain, S., Velazhahan, R., & Al-Sadi, A. M. (2024). Biocontrol Potential of *Trichoderma ghanense* and *Trichoderma citrinoviride* toward *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Fungi*. 10(4), 284. <https://doi.org/10.3390/JOF10040284>
- Baig, N., Kammakakam, I., Falath, W., & Kammakakam, I. (2021). Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*. 2(6), 1821-1871. <https://doi.org/10.1039/d0ma00807a>
- Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A. (2023). Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends in Plant Science*, 28(2), 211–222. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2022.08.024>
- Chakraborty N., Banerjee J., Chakraborty P., Banerjee A., Chanda S., Ray K., Acharya K. & Sarkar J. (2022). Green synthesis of copper/ copper oxide nanoparticles and their applications: a review. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 15(1), 187-215 <https://doi.org/10.1080/17518253.2022.2025916>
- Cheung, N., Tian, L., Liu, X., & Li, X. (2020). The destructive fungal pathogen *Botrytis cinerea*—Insights from genes studied with mutant analysis. *Pathogens*, 9(11), 923. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9110923>
- Choi J.N., Choi I.N., Lee K.J., Cho S.W., Shin H.D. & Galea V. (2018). Occurrence of gray mold caused by *Botrytis cinerea* on Okra in Korea. *Research in Plant Disease*, 24(4), 302-307. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1884-PDN>

- Consolo V.F., Torres-Nicolini A. & Alvarez V.A. (2020). Mycosynthetized Ag, CuO and ZnO nanoparticles from a promising *Trichoderma harzianum* strain and their potential against important phytopathogens. *Scientific Reports* 10, 20499. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77294-6>
- Cuevas, R., Durán, N., Diez, M. C., Tortella, G. R., & Rubilar, O. (2015). Extracellular biosynthesis of copper and copper oxide nanoparticles by *Stereum hirsutum*, a native white-rot fungus from Chilean forests. *Journal of Nanomaterials*, 2015(1), 789089. <https://doi.org/10.1155/2015/789089>
- Du, M., Ren, X., Sun, Q., Wang, Y., & Zhang, R. (2012). Characterization of *Fusarium* spp. causing potato dry rot in China and susceptibility evaluation of Chinese potato germplasm to the pathogen. *Potato Research*, 55(2), 175–184. <https://doi.org/10.1007/s11540-012-9217-6>
- El-Abeid, S. E., Mosa, M. A., El-Tabakh, M. A. M., Saleh, A. M., El-Khateeb, M. A., & Haridy, M. S. A. (2024). Antifungal activity of copper oxide nanoparticles derived from *Zizyphus spina* leaf extract against *Fusarium* root rot disease in tomato plants. *Journal of Nanobiotechnology*, 22(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02281-8>
- Elshahawy, I. E., & Marrez, D. A. (2024). Antagonistic activity of *Trichoderma asperellum* against *Fusarium* species, chemical profile and their efficacy for management of Fusarium-root rot disease in dry bean. *Pest Management Science*, 80(3), 1153–1167. <https://doi.org/10.1002/PS.7846>
- Gaba, S., Rai, A. K., Varma, A., Prasad, R., & Goel, A. (2022). Biocontrol potential of mycogenic copper oxide nanoparticles against *Alternaria brassicae*. *Frontiers in Chemistry*, 10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.966396>
- García-Marin, L. E., Juárez-Moreno, K., Vilchis-Nestor, A. R., & Castro-Longoria, E. (2022). Highly antifungal activity of biosynthesized copper oxide nanoparticles against *Candida albicans*. *Nanomaterials*, 12(21), 3856. <https://doi.org/10.3390/NANO12213856>
- Geng, L., Fu, Y., Peng, X., Yang, Z., Zhang, M., Song, Z., Guo, N., Chen, S., Chen, J., Bai, B., Liu, A., & Ahammed, G. J. (2022). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Biological Control*, 174, 105019. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2022.105019>
- González, Y., Martínez-Soto, D., de los Santos-Villalobos, S., García-Marin, L. E., Juárez-Moreno, K., & Castro-Longoria, E. (2024). Potential application of a fungal co-culture crude extract for the conservation of post-harvest fruits. *Brazilian Journal of Microbiology*, 55, 1679-1691. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01274-5>
- Guilger-Casagrande, M., Germano-Costa, T., Pasquoto-Stigliani, T., Fraceto, L. F., & Lima, R. de. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientific Reports*. 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50871-0>
- Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., Orozco-Mosqueda, M. del C., Fadji, A. E., Hyder, S., Babalola, O. O., & Santoyo, G. (2023). *Trichoderma* species: our best fungal

- allies in the biocontrol of plant diseases—A Review. *Plants*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/PLANTS12030432>
- Hu, D., Yu, S., Yu, D., Liu, N., Tang, Y., Fan, Y., Wang, C., & Wu, A. (2019). Biogenic *Trichoderma harzianum*-derived selenium nanoparticles with control functionalities originating from diverse recognition metabolites against phytopathogens and mycotoxins. *Food Control*, 106, 106748. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2019.106748>
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., & Shiping, T. (2018). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2(3), 111–119. <https://doi.org/10.1093/FQSAFE/FYY016>
- Kausar, H., Mehmood, A., Khan, R. T., Ahmad, K. S., Hussain, S., Nawaz, F., Iqbal, M. S., Nasir, M., & Ullah, T. S. (2022). Green synthesis and characterization of copper nanoparticles for investigating their effect on germination and growth of wheat. *PLOS ONE*, 17(6), e0269987. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0269987>
- Khadka, R. B., Rotondo, F., & Miller, S. A. (2022). The pursuit in nepal of native *Trichoderma* spp. for plant disease biocontrol. *Phyto Frontiers*. 2(3), 242–256. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-08-21-0051-R>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2017.05.011>
- Kim, S. H., Lee, Y., Balaraju, K., & Jeon, Y. (2023). Evaluation of *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma longibrachiatum* as biocontrol agents in controlling red pepper anthracnose in Korea. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1201875. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1201875>
- Kuzmanovska, B., Rusevski, R., Jankulovska, M., Oreshkovikj, K. B., Kuzmanovska, B., Rusevski, R., Jankulovska, M., & Oreshkovikj, K. B. (2018). Antagonistic activity of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma harzianum* against genetically diverse *Botrytis cinerea* isolates. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 78(3), 391–399. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392018000300391>
- Li Q., Liu F., Li M., Chen C., Gadd G.M. (2022). Nanoparticle and nanomineral production by fungi. *Fungal Biology Reviews*, 41, 31-44. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.07.003>
- Ma, Y., Li, Y., Yang, S., Li, Y., & Zhu, Z. (2023). Biocontrol Potential of *Trichoderma asperellum* strain 576 against *Exserohilum turcicum* in Zea mays. *Journal of Fungi*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/jof9090936>
- Malandrakis, A. A., Krasagakis, N., Kavroulakis, N., Ilias, A., Tsagkarakou, A., Vontas, J., & Markakis, E. (2022). Fungicide resistance frequencies of *Botrytis cinerea* greenhouse isolates and molecular detection of a novel SDHI resistance mutation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 183, 105058. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2022.105058>
- Mukhopadhyay, R., & Kumar, D. (2020). *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00333-x>

- Nagajyothi, P. C., Muthuraman, P., Sreekanth, T. V. M., Kim, D. H., & Shim, J. (2017). Green synthesis: *In-vitro* anticancer activity of copper oxide nanoparticles against human cervical carcinoma cells. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(2), 215–225. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2016.01.011>
- Parada, J., Tortella, G., Seabra, A. B., Fincheira, P., & Rubilar, O. (2024). Potential antifungal effect of copper oxide nanoparticles combined with fungicides against *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*. *Antibiotics*, 13(3), 215. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13030215>
- Poveda, J., Barquero, M., & González-Andrés, F. (2020). Insight into the microbiological control strategies against *Botrytis cinerea* using systemic plant resistance activation. *Agronomy*, 10(11), 1822. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10111822>
- Ramírez-Valdespino, C. A., & Orrantia-Borunda, E. (2021). *Trichoderma* and nanotechnology in sustainable agriculture: a Review. *Frontiers in Fungal Biology*, 2, 764675. <https://doi.org/10.3389/FFUNB.2021.764675>
- Rupp, S., Weber, R. W. S., Rieger, D., Detzel, P., & Hahn, M. (2017). Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in german horticulture. *Frontiers in Microbiology*, 7, 228887. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02075>
- Sabine Fillinger, & Yigan Elad. (2016). *Botrytis*-the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. *Springer cham*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- Sadek M.E., Shabana Y., Sayed-Ahmed K. & Tabl A.H.A. (2022). Nanoparticles activities of sulfur and copper nanoparticles against cucumber postharvest disease caused by *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotium*. *Journal of Fungi*, 8(4). [10.3390/jof8040412](https://doi.org/10.3390/jof8040412)
- Sánchez-Montesinos, B., Santos, M., Moreno-Gavira, A., Marín-Rodulfo, T., Gea, F. J., & Diáñez, F. (2021). biological control of fungal diseases by *Trichoderma aggressivum* f. europaeum and its compatibility with fungicides. *Journal of Fungi*, 7(8), 598. <https://doi.org/10.3390/JOF7080598>
- Saravanakumar K., Shanmugam S., Varukattu N.B., MubarakAli D., Kathiresan K. & Wang M.H. (2018). Biosynthesis and characterization of copper oxide nanoparticles from indigenous fungi and its effect os photothermolysis on human lung carcinoma. *Photochemistry and Photobiology*, 190, 103-109. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.11.017>
- Selvaraj M., Pandurangan P., Ramasami N., Rajendran S.B.M Sangilimuthu S.N. & Perumal P. (2014). Highly potential antifungal activity of quantum sized silver nanoparticles against *Candida albicans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173 (1), 55-66. [10.1007/s12010-014-0782-9](https://doi.org/10.1007/s12010-014-0782-9)
- Shahzad, A., Saeed, H., Iqtedar, M., Hussain, S. Z., Kaleem, A., Abdullah, R., Sharif, S., Naz, S., Saleem, F., Aihetasham, A., & Chaudhary, A. (2019). Size-controlled production of silver nanoparticles by *Aspergillus fumigatus* BTCB10: likely antibacterial and cytotoxic effects. *Journal of Nanomaterials*, 5168698. <https://doi.org/10.1155/2019/5168698>

- Shao, W., Zhao, Y., & Ma, Z. (2021). Advances in understanding fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in China. *Phytopathology*, 111(3), 455–463. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0313-IA/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-07-20-0313-IAT1.JPEG>
- Sintubin, L., De Windt, W., Dick, J., Mast, J., Van Der Ha, D., Verstraete, W., & Boon, N. (2009). Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(4), 741–749. [10.1007/s00253-009-2032-6](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2032-6)
- Slavin Y. & Bach H. (2022). Mechanism of antifungal properties of metal nanoparticles. *Nanomaterials*, 12 (24), 4470. [10.3390/nano12244470](https://doi.org/10.3390/nano12244470)
- Sofianos, G., Samaras, A., & Karaoglanidis, G. (2023). Multiple and multidrug resistance in *Botrytis cinerea*: molecular mechanisms of MLR/MDR strains in Greece and effects of co-existence of different resistance mechanisms on fungicide sensitivity. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1273193. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1273193>
- Song, Y. P., & Ji, N. Y. (2024). Chemistry and biology of marine-derived *Trichoderma* metabolites. *Natural Products and Bioprospecting*, 14(1), 1–54. <https://doi.org/10.1007/S13659-024-00433-3>
- Stracquadanio C., Quiles J.M., Meca G. & Cacciola S.O. (2020). Antifungal activity of bioactive metabolites produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviridae* in liquid medium. *Journal of Fungi*, 6(4), 263. [10.3390/jof6040263](https://doi.org/10.3390/jof6040263)
- Tchameni, S. N., Cotârleț, M., Ghinea, I. O., Bedine, M. A. B., Sameza, M. L., Borda, D., Bahrim, G., & Dinică, R. M. (2020). Involvement of lytic enzymes and secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Pythium myriotylum*. *International Microbiology*, 23(2), 179–188. [10.1007/s10123-019-00089-x](https://doi.org/10.1007/s10123-019-00089-x)
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuk-Ścisieł, J. (2022). *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
- Waris, A., Din, M., Ali, A., Ali, M., Afridi, S., Baset, A., & Ullah Khan, A. (2021). A comprehensive review of green synthesis of copper oxide nanoparticles and their diverse biomedical applications. *Inorganic Chemistry Communications*, 123, 108369. <https://doi.org/10.1016/J.INOCHE.2020.108369>
- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., Van Kan J.A.L. (2017). *Botrytis cinerea*: the cause of gray mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8 (5), 561-580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Yassin, M. T., Mostafa, A. A. F., & Al-Askar, A. A. (2022). *In vitro* antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against fungal pathogens causing black point disease of wheat. *Journal of Taibah University for Science*, 16(1), 57–65. <https://doi.org/10.1080/16583655.2022.2029327>

- Yin, Y., Miao, J., Shao, W., Liu, X., Zhao, Y., & Ma, Z. (2023). Fungicide resistance: progress in understanding mechanism, monitoring, and management. *Phytopathology*, 113(4), 707–718. [10.1094/PHYTO-10-22-0370-KD](https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-22-0370-KD)
- Zapata-Narváez, Y. A., Díaz-García, A., & Beltrán-Acosta, C. R. (2023). Alternatives for the gray mold (*Botrytis cinerea*) control in cape gooseberry (*Physalis peruviana*) crop. *Mexican Journal of Phytopathology*, 41(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2302-5>

Anexos

Anexo A

Tabla 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio de *Botrytis cinerea* CDBBH1556 en confrontación con diferentes especies de *Trichoderma*.

% Inhibición del crecimiento radial del micelio		
Tratamiento	SN 1	SN 2
<i>T. atroviridae</i>	16.7 ± 1.52	9.72 ± 2.40
<i>T. asperellum</i> T8A	18.35 ± 0.57	41.66 ± 4.1
<i>T. harzianum</i> C4B	0 ± 0	6.94 ± 2.94
<i>T. ghanense</i> C4A	15 ± 1	73.61 ± 4.81

Anexo B

Tabla 9. Inhibición del crecimiento radial de *B. cinerea* CDBBH1556 con la CMI de cada formulación. Controles añadidos: sobrenadante, sal precursora y control sin adición.

% Inhibición del crecimiento radial del micelio				
Tratamiento (40%)	TAP 15	TAD 15%	TGP 15	TGD15
CuONPs (160 µg/mL)	68.66 ± 5.50	91.66 ± 7.63	73.33 ± 2.88	100 ± 0
Sobrenadante	58.33 ± 7.63	60 ± 10	76.66 ± 7.63	86.66 ± 2.88
Sal precursora	8.33 ± 7.63			
Control sin adición	0 ± 0			

Anexo C

Tabla 10. Inhibición del crecimiento radial de *B. cinerea* aislada de campo. Tratamientos con CuONP, sobrenadantes, sal precursora y medios sin adición

% Inhibición del crecimiento radial del micelio				
Tratamiento	TAP 15 170 µg/mL	TAD 15 170 µg/mL	TGP 15 170 µg/mL	TGD15 170 µg/mL
CuONPs (42 %)	81.66 ± 2.88	95 ± 5	91.66 ± 5.77	98.33 ± 2.88
Sobrenadante (42 %)	68.33 ± 11.54	53.33 ± 15.3	71.7 ± 5.77	86.7.33 ± 2.88
Sal precursora (42%)	6.7 ± 2.9			
Control sin adición	0 ± 0			

Anexo D

Factor de elongación 1 alpha (EF1- α) de *Botrytis cinerea* asilado de campo

```
GGAACATAGATGTCTATGGTAGAACCACGTTACGCTCAGCCTTTAGCTTGTCCAAAACCCATGCGTACTTGAAGG
AACCCCTTCCGAGTTCGGCACTTCCTATGATGGTTGTTATCTCACGCTGCAAAAGCATGTTGACACATCTATGTGGTT
CAACAATGACATAATTTGTTGATGTACTGCAACTGCCCGCCGCGCCACAAAATTCTATTGTGTAACACAAAAGAA
CATGGTGGCACCTCTAGCTTCTGCGACTACAACAGCTGAGTACATGGAGACCATCCCTAGAAGCATTGCTACTAAT
GCATCAACTACAGAATGATGTGGGCAAACAGTATCTGGTTAAAATACCCCAATACTGGTATGATCACACCAACCAC
TCTGATACCGGAGAGCCCTATATAATCTCTAGGCCTAATACTCCAACTGCAGCCAACCCAAACAACCTCCAGACACAT
CAAGTGGAAGTGTTCAAAACTCGACGCACCCTGTTAGGATGCTCTA
```