

FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
MONTEVIDEO - URUGUAY

2023

TECNOLOGÍAS DE MULTIPLICACIÓN Y FORMULACIÓN DE CEPAS DE TRICHODERMA PARA EL DESARROLLO DE UN BIOINSUMO DE USO AGRÍCOLA

TESIS DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

MAGDALENA OLIVERA ALEGRE

TUTOR: DR. ING. AGRÓNOMO EDUARDO ABREO, BIOINSUMOS INIA LAS BRUJAS

TUTOR ACADEMICO: DRA. SILVANA ALBORES, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA – FACULTAD DE QUÍMICA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor, Dr. Eduardo Abreo, por su dedicación y ayuda, sin su guía, correcciones y consejos no hubiese podido llegar a esta instancia. Fue un placer aprender y crecer junto a él. También, a mi tutora académica Silvana Albores por su apoyo y disponibilidad. Gracias a ellos por el tiempo dedicado y por la confianza en mí para formar parte del Proyecto.

Gracias a las Instituciones que brindaron la financiación y me permitieron desarrollar este trabajo: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la beca de maestría y el Proyecto INNOVAGRO FSA_1_2018_1_152546, Comisión Académica de Posgrado (CAP) por la beca de finalización de maestría, a Posgrado Biotecnología y al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). A la Universidad de la República que me ha brindado las herramientas para crecer académica y profesionalmente en el camino para obtención del título.

A todos mis compañeros de la Plataforma Bioinsumos – INIA Las Brujas, gracias por estos años compartidos, los trabajos realizados en conjunto, la calidad y amabilidad que hicieron el día a día más fácil. Destaco la infaltable disposición y ayuda de todo el equipo, especialmente Beatriz Dini y Natalia Mattos. Gracias a mis compañeros de oficina por el apoyo y sus consejos.

Al Dr. Sebastián Martínez y su equipo que me ayudaron en la realización de ensayos en INIA Treinta y Tres. A él, a la Dra. Silvia Pereyra, la Dra. Sandra Lupo y Dra. Silvana Vero por brindarnos las cepas de trabajo, y por todos los aportes a lo largo de estos años de trabajo, particularmente a Silvana Vero por el seguimiento y evaluación del Proyecto.

Gracias a la Dra. Diana Valle por su paciencia y disposición para compartir sus conocimientos, los cuales me ayudaron a realizar el análisis estadístico de los resultados.

Por último, le agradezco a mi familia y especialmente mi esposo: Juan, por su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos.

Gracias a todos los que me acompañaron en este camino, ha sido un gran desafío.

RESUMEN

Alcanzar una disminución del uso de agroquímicos y de los efectos negativos asociados a su uso continuado ha llevado a la búsqueda de soluciones tecnológicas novedosas, con menor impacto ambiental, que aseguren la sostenibilidad de la producción agropecuaria. En este camino, el uso de microorganismos en la agricultura se ha proyectado como un área de investigación y desarrollo que busca complementar las herramientas ya existentes para el manejo de ecosistemas productivos de forma sustentable.

Hongos del género *Trichoderma* son reconocidos por tener múltiples interacciones positivas con los vegetales, incluyendo promoción del crecimiento, disponibilización de nutrientes del suelo y defensa contra patógenos. Una limitante para el desarrollo de cepas de interés en productos comercializables suele ser la dificultad técnica de obtener un producto formulado con capacidad de ser conservado y de fácil adopción y uso por los agricultores.

Por lo tanto, el presente trabajo buscó seleccionar cepas de *Trichoderma* de interés por su acción como promotoras del crecimiento de trigo y arroz, con potencial para el control biológico de hongos patógenos de estos cultivos y adicionalmente, compatibles con una estrategia de formulación mediante microencapsulado y secado por *spray drying*.

El encapsulado y secado implicó un último nivel de screening de las cepas en las que se evaluó la compatibilidad y sinergia con quitosano, disponible comercialmente, que fue incluido por su doble función de agente encapsulante y antimicrobiano. Una cepa de *Trichoderma asperellum*, originalmente aislada como endófito de plantas de arroz, fue seleccionada por su capacidad de promover la germinación, el desarrollo vegetal, el control biológico de hongos patógenos de estos cultivos y por su compatibilidad para ser formulado en conjunto con quitosano y otros coadyuvantes mediante *spray drying*. Finalmente, utilizando quitosano, PEG y maltodextrina como encapsulantes y protectores se obtuvo un formulado en polvo con sobrevivencia de esporas > a 80% y humedad cercana a 0,3 en valor de a_w que demostró similar actividad benéfica sobre las plantas que la cepa sin formular.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Enfermedades de cultivos de arroz y trigo.....	1
1.1.1. Enfermedades del arroz.....	1
1.1.2. Enfermedades de trigo	3
1.2. Control Biológico.....	4
1.2.1. Control Biológico en trigo y arroz	7
1.3. <i>Trichoderma</i> spp.	8
1.3.1. Actividad benéfica en plantas.....	9
1.4. Producción y Formulación	12
1.4.1. Producción de <i>Trichoderma</i>	12
1.4.2. Formulación	13
1.4.3. Microencapsulación.....	14
1.4.4. Microencapsulación por <i>spray drying</i>	16
1.5. Quitosano	19
2. HIPOTESIS	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo General.....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. Hongos patógenos y cepas de <i>Trichoderma</i>	25
4.2. Caracterización de aislados de <i>Trichoderma</i>	25
4.2.1. Promoción de crecimiento.....	25
4.2.2. Control biológico.....	26
4.2.3. Compatibilidad <i>Trichoderma</i> – Agente encapsulante.....	27
4.2.4. Multiplicación en medio sólido.....	30
4.3. Producción de formulado	31

4.3.1.	Selección de agentes encapsulantes	31
4.3.2.	Preparación de suspensión	32
4.3.3.	Selección de las condiciones de trabajo del <i>Spray-dryer</i>	32
4.3.4.	Recolección y análisis del formulado	33
4.3.5.	Microscopía electrónica de barrido	34
4.4.	Actividad del formulado en planta	34
4.4.1.	Efecto del formulado sobre la germinación de semillas	34
4.4.2.	Efecto del formulado en la promoción de crecimiento	39
4.4.3.	Efecto del formulado en el control biológico	41
5.	RESULTADOS	47
5.1.	Caracterización de aislados de <i>Trichoderma</i>	47
5.1.1.	Promoción de crecimiento vegetal	47
5.1.2.	Control Biológico <i>in vitro</i>	49
5.1.3.	Compatibilidad <i>Trichoderma</i> – agente encapsulante	52
5.1.4.	Multiplicación en medio sólido	60
5.1.5.	Selección de cepa a encapsular	60
5.1.6.	Efecto del quitosano en la producción de <i>Trichoderma</i>	61
5.2.	Producción de formulado	62
5.2.1.	Producción y evaluación del formulado	62
5.2.2.	Microscopía electrónica de barrido	65
5.3.	Evaluación del formulado	67
5.3.1.	Efecto del formulado en la germinación de semillas	67
5.3.2.	Efecto del formulado en la promoción de crecimiento vegetal	72
5.3.3.	Efecto del formulado en el Control Biológico	74
6.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	80
6.1.	Caracterización y selección de <i>Trichoderma</i> spp.	80
6.2.	Formulación	85
6.3.	Actividad del formulado	87

7. BIBLIOGRAFÍA.....	91
APÉNDICE A. CONTROL DE PATOGENOS CON <i>TRICHODERMA</i> Y QUITOSANO	101
APÉNDICE B. COMPATIBILIDAD DEL POLÍMERO NATURAL (QUITOSANO) CON CONTROLADOR BIOLOGICO (<i>TRICHODERMA</i>).	103
APÉNDICE C. BIOENSAYOS DE PATOGENICIDAD <i>IN VIVO</i>	104

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades de cultivos de arroz y trigo

En Uruguay, los cultivos de arroz y trigo son considerados de alto interés económico; según el Anuario Agropecuario (DIEA) 2022, en la zafra 2021/22 ambos cultivos presentaron un incremento en el área sembrada, rendimiento y producción respecto a la zafra anterior. El cultivo de arroz alcanzó las 152,1 mil hectáreas sembradas y el trigo 244,4 mil ha (DIEA 2022). Sin embargo, su producción se puede ver gravemente afectada por la presencia de enfermedades, siendo las más destacadas aquellas enfermedades causadas por hongos (Pereyra *et al.*, 2005; Martínez y Escalante, 2017).

1.1.1. Enfermedades del arroz

Las enfermedades de implantación de los cultivos son causadas por patógenos presentes en el suelo o en las semillas, que frecuentemente generan disminución de la germinación e infección de las plántulas (mancha, *damping off*), que llevan a la reducción de vigor y manifestación de síntomas en las plantas adultas y pérdidas en rendimiento del cultivo (manchas y pigmentación, deformación o reducción en el peso del grano). Además, estos patógenos pueden causar muerte pre y post emergencia (Pereira y Rossi, 2018).

La presencia de patógenos en semilla, que causa deformación y/o pigmentación del grano de arroz afectando su constitución y aspecto, es comúnmente llamada “manchado del grano”. Los agentes causales de esta enfermedad varían de una región a otra, siendo por ejemplo *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata* y *Fusarium graminearum* las especies mayormente encontradas por Pinciroli *et al.* (2003) en cultivo de arroz en la región de Buenos Aires, Argentina. Algunos de los patógenos frecuentemente encontrados en el suelo son *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia* spp., siendo éstos los principales responsables de enfermedades severas como el *damping off* (Cuevas *et al.*, 1988). Además de las anteriores, alguna de las principales enfermedades del cultivo de arroz encontradas en Uruguay y que serán la base para el presente trabajo son la podredumbre del tallo y las manchas de las vainas. Los hongos *Nakataea oryzae*, *Rhizoctonia oryzae* y *Rhizoctonia oryzae-sativae*, son los patógenos

causantes de dichas enfermedades, generando las pérdidas más importantes en este cultivo (Martínez y Escalante, 2017).

Nakataea oryzae es el agente causal de la podredumbre del tallo, siendo la fuente de inóculo inicial los esclerocios presentes en el suelo y el rastrojo. En la lámina de agua los esclerocios flotan en superficie y germinan. Posteriormente las hifas que crecen desde estos esclerocios o restos vegetales flotando, penetran en los tejidos vegetales y generan la infección. En suelos con historia de la enfermedad, la podredumbre del tallo puede aparecer en forma generalizada causando grandes pérdidas de rendimiento (Martínez *et al.*, 2018). Los primeros síntomas son manchas irregulares negras de tejido necrosado en las vainas externas del tallo y a la altura de la columna de agua, provocadas por la penetración del hongo. Cuando la enfermedad progresa, las lesiones se expanden y el micelio penetra a las vainas internas causando en ocasiones la muerte de la vaina y hojas. Ocasionalmente el hongo penetra y pudre los nudos y tallos interrumpiendo la circulación de nutrientes. En el interior de los tallos más afectados se forman nuevos esclerocios que posteriormente permanecerán en el suelo como fuente de inóculo para sucesivos cultivos.

Las podredumbres causan vuelco de tallos, mal llenado y yesado de los granos, y en casos graves la muerte completa de la planta (Martínez *et al.*, 2018).

Las enfermedades “mancha de las vainas” y “mancha agregada de las vainas” son causadas por los hongos *Rhizoctonia oryzae* y *Rhizoctonia oryzae-sativae*. En ambas enfermedades la fuente de inóculo primario son los esclerocios en el suelo y el rastrojo, o micelio en restos vegetales. Cuando se inunda el cultivo, los esclerocios flotan en el agua y se activan. La infección ocurre por la penetración de las hifas en la planta. También pueden ocurrir infecciones por micelio de una planta infectada a una planta sana (Martínez *et al.*, 2018).

Estas enfermedades ocurren generalmente en plantas aisladas progresando a manchones o parches en el cultivo, pero pueden también aparecer generalizadas en suelos de las chacras con larga historia de cultivo y de la enfermedad. Los síntomas aparecen en forma de manchas ovaladas sobre la parte

inferior de las vainas. En “la mancha de la vaina” la infección no progresa verticalmente hacia las hojas superiores de la planta, como sí ocurre en el caso de “la mancha agregada”. “La mancha de la vaina” es una enfermedad similar a “la mancha agregada” pero aparentemente menos agresiva y más común en algunas áreas arroceras. En ambos casos las láminas de las vainas afectadas amarillean y en casos graves las plantas mueren (Martínez *et al.*, 2018).

Tradicionalmente se han usado curasemillas y fungicidas foliares con el fin de proteger las semillas y plántulas del ataque de hongos patógenos. Curasemillas fungicidas en base a azoxistrobin y tricyclazole demostraron mantener una mayor población de plantas al momento de la inundación. Además, diferentes fungicidas foliares mostraron disminuir la severidad de enfermedades de tallo y vaina, y algunos alcanzaron menor número de plantas muertas o dañadas al momento de la cosecha (Martínez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2014).

1.1.2. Enfermedades de trigo

Una de las principales limitantes del cultivo de trigo son las enfermedades fúngicas que pueden aparecen en cualquiera de las etapas fenológicas de la planta (Pereyra *et al.* 2011).

La presencia de patógenos en semillas puede generar importantes pérdidas ya que éstos pueden afectar la germinación e implantación del cultivo o ser una fuente primaria de infección de la parte aérea. Distintas especies de hongos patógenos del género *Fusarium* han sido encontrados en granos de trigo en Uruguay, entre ellas *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* y *F. poae* (Pereyra *et al.*, 2003, 2006). El principal agente etiológico de las enfermedades de trigo, a nivel mundial, es *Fusarium graminearum*. Dentro de esta especie se han reconocido, hasta el momento, 13 linajes diferentes (Pereyra *et al.*, 2011). Esta especie es principalmente conocida por ser la responsable de la fusariosis de la espiga (FE), enfermedad que causa grandes pérdidas de rendimiento y calidad en granos de trigo a nivel mundial, además de representar una amenaza a la inocuidad del producto final por la producción de micotoxinas por parte del complejo de hongos causales de la FE. Estos patógenos afectan el grano cosechado, y por tanto son capaces de afectar la producción de semilla, mediante la

cual se propaga e induce la enfermedad en la fase de plántula del siguiente cultivo (Pereyra *et al.*, 2011).

En este sentido, *F. graminearum* está asociado a una menor germinación de las semillas y al marchitamiento de plántulas (Dal Bello *et al.*, 2002).

Para el manejo de lotes de semilla con alta carga de *Fusarium* se recomienda la limpieza, clasificación y tratamiento de la semilla con fungicidas curasemillas que permiten mejorar la implantación. Sin embargo, el uso de fungicidas de síntesis puede favorecer la selección de cepas resistentes y resultar contraproducente desde el punto de vista del impacto ambiental del cultivo (Pereyra *et al.*, 2011).

La producción local de trigo en Uruguay en 2022 estuvo caracterizada por un abundante volumen de producción nacional superior al año previo, con excelentes condiciones de calidad e inocuidad del grano. No se registraron problemas sanitarios importantes. Las condiciones favorables a la infección y desarrollo de la fusariosis de la espiga ocurrieron en periodos muy cortos, dado que durante la primavera el predominio de períodos de escasa humedad impidió su desarrollo (Anuario OPYPA 2022).

1.2. Control Biológico

El manejo tradicional de las enfermedades de las plantas cultivadas basado en aplicaciones periódicas de fungicidas es cada vez más cuestionado. En respuesta a las exigencias actuales de la sociedad, se han buscado implementar sistemas de manejo integrado de las enfermedades, en los que se trata de minimizar el uso de fungicidas sintéticos, recurriendo a técnicas y productos de bajo impacto ambiental. El control biológico (CB) aparece como una herramienta indispensable al momento de diseñar y poner en práctica sistemas de manejo integrado (Mondino y Vero, 2006). El hecho de que el CB pueda asociarse con otros métodos de control sin dejar residuos en los alimentos es sin duda una de las mayores ventajas del método, constituyendo una importante alternativa para atender el mercado de productos y alimentos inocuos, libres de residuos de productos químicos (Braga, 2019).

Se entiende por control biológico a la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades causantes de enfermedades de un patógeno o parásito en su estado activo o durmiente, mediante la acción de uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del

ambiente, del hospedero o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar (Baker y Cook, 1974).

Eilenberg *et al.* (2001) enfatizaron que el término control biológico debe ser utilizado exclusivamente para agentes vivos, excluyendo así otros agentes naturales, seminaturales, metabolitos producidos por microorganismos, o el uso de sus genes. Con el fin de proporcionar un concepto y terminología global sobre el control biológico, Stenberg *et al.* (2021) determinaron tres principios del control biológico: 1) solo agentes vivos pueden desarrollar el CB, 2) el CB siempre se dirige a una plaga, directa o indirectamente, y 3) todos los métodos de CB se pueden clasificar en 4 categorías detalladas a continuación.

Las 4 categorías se diferencian según los Agentes de Control Biológico (ACB) sean residentes sin intervención humana (Control Biológico Natural) o con intervención humana (Control Biológico de Conservación), o agentes agregados de forma permanente o temporal (CB Clásico y CB Aumentativo). El CB Natural es aquel que existe en la naturaleza, sin intervención humana, generado por la interacción de organismos vivos controladores y organismos plagas allí presentes. Se define Control Biológico de Conservación cuando se utilizan prácticas para estimular el aumento en la población o la eficacia de los ACB residentes. En tercer lugar, el CB Clásico, denominado así por su uso desde hace muchos años, refiere a la introducción para establecimiento permanente de un agente de biocontrol exótico. El desarrollo de este método de control ha disminuido debido a la mayor importancia que se les ha dado a los posibles riesgos de esta introducción. Por último, el CB Aumentativo involucra la aplicación de agentes de biocontrol con la intención de controlar pestes temporalmente.

Por otro lado, con el fin de evitar problemas de terminología la IBMA (*International Biocontrol Manufacturer's Association*) promueve el término más amplio bioprotectores, el cual engloba todas las herramientas de protección de origen biológico. De esta forma, los bioprotectores incluyen agentes de biocontrol vivos y sustancias no vivas de origen biológico. Sin embargo, los compuestos no vivos pueden ser parte de los mecanismos de biocontrol cuando son producidos por los organismos vivos *in situ* (Stenberg *et al.*, 2021).

Los ACB han sido usados en combinación con fungicidas con el fin de lidiar con las limitaciones o inconsistencias que los biocontroladores han presentado. Además, en busca de mejorar la eficacia lograda por un biocontrolador de forma individual, se ha visto incrementado el estudio de mezclas de ACB, buscando combinar mecanismos de control (Xu *et al.*, 2011).

Comparado con el ACB más efectivo, el uso combinado de dos ACB puede dar lugar a un aumento, una reducción, o similar eficacia de biocontrol, es decir, sinergia, antagonismo o aditividad de efectos. Efecto aditivo significa que la eficacia de la mezcla es igual a la suma de las eficacias de cada controlador independiente, mientras que el efecto sinérgico sugiere que la eficacia de la mezcla es mejor que la suma de los efectos individuales. Antagonismo implica que la eficacia obtenida es menor que la suma de los componentes individuales (Xu *et al.*, 2011; Jambhulkar *et al.*, 2018).

Para poner en práctica estrategias de CB es necesario conocer en profundidad el ciclo biológico del patógeno, el ciclo de la enfermedad, la biología de la planta hospedera, la biología del agente de control biológico, requerimientos ambientales, así como las características epidemiológicas de la enfermedad. Estos conocimientos son los que permiten definir los momentos, sitios y estrategias más oportunos de intervención (Mondino y Vero, 2006).

En el año 2006 ya se encontraban disponibles en el mercado internacional más de 50 productos biológicos, biofungicidas, con aplicación en semilla o pulverización procedentes principalmente de USA e Israel. El agente activo de la mayoría de esos productos es un hongo o una bacteria, y algunos contienen levaduras. La mayoría de estos productos están dirigidos a patógenos de suelo (*Rhizoctonia solani*, *Pythium spp.*, *Phytophthora spp.*, *Fusarium spp.*, *Sclerotium spp.*, *Verticillium spp.*, *Agrobacterium tumefaciens*) y a enfermedades de partes aéreas (antracnosis, oidio, mildiu, *Cercospora spp.*, *Heterobasidium annosum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*), y los agentes activos utilizados son *Coniothyrium minitans*, *Streptomyces griseovirides*, *Trichoderma harzianum*, *Pseudomonas chlororafis* entre otros (Melgarejo y De Cal, 2006).

1.2.1. Control Biológico en trigo y arroz

Se han utilizado bacterias identificadas como *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Bacillus* para la inoculación de semillas de trigo, mostrando un efecto importante contra enfermedades como el tizón de la planta, *damping off* y problemas de germinación generados por los patógenos *Microdochium nivale*, *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum*. Además, cepas de *Bacillus* y hongos del género *Trichoderma* aislados de suelo han mostrado inhibición del crecimiento *in vitro* del patógeno *F. graminearum* e inhibición de enfermedad en ensayos de invernáculo (Amein *et al.*, 2008; Johansson *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2006; Dal Bello *et al.*, 2002).

En Uruguay, desde 2003 se vienen llevando a cabo trabajos con el fin de determinar la efectividad del uso de aislamientos de *Trichoderma* como agentes de control biológico para las enfermedades del trigo (Pereyra *et al.*, 2005). Cabrera (2009) y Villar *et al.* (2022) estudiaron la dinámica poblacional de *Trichoderma* spp. en rastrojo de trigo y seleccionaron cepas con actividad contra *Fusarium graminearum*.

Para el control de enfermedades de arroz también se han usado hongos y bacterias como agentes de biocontrol. A nivel de campo, mediante tratamiento de semillas o aplicación foliar se han utilizado con éxito bacterias aisladas de la rizósfera de arroz, aislados de *Pseudomonas fluorescens* y aislados de *Trichoderma viride* para el control de la mancha de la vaina de arroz causada por el patógeno *Rhizoctonia solani* (Nagaeaju *et al.*, 2002; Mew y Rosales, 1989). Además, aislados de *Streptomyces*, *Bacillus*, *Trichoderma* y *Pseudomonas aeruginosa* han mostrado potencial como controladores biológicos de los patógenos *Pyricularia oryzae*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium oryzae* y *Xanthomonas oryzae* causantes de las enfermedades quemado de arroz, podredumbre de tallo, mancha de vaina, mancha de grano y mancha de la hoja (Law *et al.*, 2017; Sethi y Mukherjee, 2018; Ph *et al.*, 2011; Yasmin *et al.*, 2017).

Por otro lado, en Uruguay se ha trabajado en la selección e identificación de cepas de *Trichoderma* nativas, presentes como endófitas de raíces de plantas de arroz y provenientes de suelos arroceros.

Se obtuvieron aislados de cepas que demostraron inhibición de algunos de los principales patógenos (Ruiz *et al.*, 2013).

Actualmente, se han seleccionado microorganismos por su habilidad para antagonizar o controlar patógenos de plantas de trigo y arroz, se han obtenido cepas eficientes con las que se ha logrado desarrollar formulados comerciales. Por ejemplo, Rizoderma® y TRICHOSOIL® son productos con disponibilidad en Uruguay. Rizoderma® es un biofungicida para el tratamiento de semilla a base de *Trichoderma harzianum*, producido por la empresa Rizobacter y con acción benéfica en diversos cultivos, entre ellos trigo y arroz. TRICHOSOIL® es un biofungicida en base a *Trichoderma harzianum* con eficacia frente a *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotium*, *Sclerotinia* y *Botrytis*, elaborado por la empresa LAGE y Cia S.A.

1.3. *Trichoderma* spp.

Hongos del género *Trichoderma* han sido estudiados y reconocidos por sus actividades benéficas sobre los vegetales, ya sea como agentes de control biológico de enfermedades o como promotores de crecimiento, por ello su gran importancia agroindustrial (Hermosa *et al.*, 2012).

El género *Trichoderma* pertenece a la familia *Hypocreaceae* (orden *Hypocleales*, clase *Sordariomycetes*, phylum *Ascomycota*). Es un hongo que macroscópicamente se evidencia como colonias de rápido crecimiento, inicialmente blancas que con el tiempo se tornan verdes, amarillas o amarronadas por la producción de conidios. A nivel microscópico presenta conidióforos ramificados, fiálides en forma de botella de donde se originan los conidios. Sus hifas delgadas pueden ser globosas o elipsoidales y dependiendo de la especie la pared puede ser lisa o rugosa (Vasquez, 2010). Es un hongo filamentoso, saprofítico, anamórfico, aerobio, que cuenta con una pared celular compuesta principalmente por quitina, se reproduce de forma asexual y se encuentra en una alta densidad en el suelo. Puede ser encontrado en material vegetal en descomposición, en la rizósfera o en el interior de las raíces de plantas. De fácil adaptación, tiene capacidad de desarrollarse en amplios rangos de temperatura, pH, humedad, entre otros (Vasquez, 2010).

1.3.1. Actividad benéfica en plantas

La exitosa capacidad de *Trichoderma* spp. de colonizar diversos hábitats se refleja en su eficiente utilización de los sustratos disponibles, así como la capacidad de secreción de metabolitos, antibióticos y enzimas (Vasquez, 2010). Además de buenas competidoras por espacio y nutrientes, otros mecanismos de competencia directa de las cepas de *Trichoderma* spp. comprenden armas enzimáticas y químicas que confieren a estas especies características de micoparásitos. Durante el proceso de micoparasitismo *Trichoderma* secreta enzimas que hidrolizan la pared celular de los hongos que parasita, siendo las más conocidas las proteasas, quitinasas y glucanasas, provocando la retracción de la membrana plasmática y la desorganización del citoplasma. Las enzimas secretadas también inhiben la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo (Hernández Melchor *et al.*, 2019). Otro mecanismo utilizado es la antibiosis, generada por la secreción de compuestos tóxicos volátiles y no volátiles (Hermosa *et al.*, 2012; Bastías *et al.*, 2022).

El biocontrol también puede desarrollarse, en forma indirecta, a través de la inducción de resistencia sistémica de plantas, que es mediada por alteraciones en la expresión genética de la planta. Una vez en la rizósfera, *Trichoderma* puede estimular la expresión de una variedad de compuestos en la planta hospedera, como proteínas o metabolitos secundarios que activan las fitohormonas relacionadas a la defensa de la planta: ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno. La percepción se lleva a cabo por receptores específicos ubicados en las membranas de las células vegetales, tales como quinasas e histidina. La acumulación de hormonas ligadas a la defensa también ocurre en tejidos distantes gracias a proteínas que distribuyen sistémicamente las señales de defensa.

Por lo tanto, la ventaja del uso de cepas de *Trichoderma* para controlar microorganismos radica en la potencial expresión simultánea de varios mecanismos directos e indirectos de protección de las plantas. Es así como distintas estructuras del hongo (esporas, hifas y clamidosporas) o sus metabolitos han sido utilizados como fungicidas biológicos (Braga, 2019; Vinale, 2009).

Existen numerosos estudios utilizando hongos del género *Trichoderma* como controladores biológicos de hongos fitopatógenos. Sus especies son las más utilizadas para el control de fitopatógenos en el

mundo, hecho que puede explicarse por la capacidad de adaptarse a una gran variedad de ambientes, ser fáciles de cultivar y de rápido desarrollo en varios sustratos (Braga, 2019).

Se han descrito cepas de *Trichoderma* spp. capaces de colonizar las raíces de plantas e incluso relacionarse de forma endofítica, actuando en la promoción del crecimiento, en la defensa contra fitopatógenos radiculares y fitopatógenos de partes aéreas e induciendo resistencia sistémica a la planta (Harman y Bjorkman, 1998). Otros autores han caracterizado hongos del género *Trichoderma* como controladores biológicos de patógenos de suelo, tanto en asociación con la planta como a distancia por ser capaces de parasitar y destruir formas de resistencia y propagación de los hongos fitopatógenos. Por ejemplo, se han encontrado cepas de *Trichoderma* spp. capaces de colonizar y dejar inviables esclerotos de diferentes hongos (Mondino y Vero, 2006). Mew y Rosales (1985) describen a *Trichoderma* como controlador de enfermedades del cultivo de arroz, relacionando esta capacidad con su habilidad de descomponer celulosa. Afirman que el rastrojo de arroz brinda protección y hábitat para el patógeno durante los intervalos entre cosechas. Indican que *T. harzianum* y *T. atroviride* descomponen rápidamente los restos de arroz privando así a patógenos como *R. solani* de nutrientes. De esta manera, el potencial de patógenos en el rastrojo para la siguiente temporada de cultivo se reduce significativamente.

Menos estudiado es el efecto del tratamiento con *Trichoderma* en la germinación e instalación temprana de una plántula. Kakyan *et al.* (2013) demostraron que aislados de *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum* y *T. flavus* presentan efecto antagónico sobre cepas de *R. solani*, patógeno causante de *damping off* y podredumbre de semillas. Se han utilizado cepas de *Trichoderma* para reducir enfermedades de emergencia de plantines. En estos casos, el agente biocontrolador ha sido aplicado en recubrimientos de semillas. Si la cepa utilizada es buena colonizadora, se logra una protección desde el inicio de la germinación (Ezziyyani *et al.*, 2004). Semillas de tomate tratadas con una cepa de *Trichoderma* germinaron más rápido y en forma más consistente cuando se encontraban en situación de estrés, ya sea fisiológico (edad de la semilla), osmótico, salino o por temperatura. La respuesta observada ante diversos estresores sugiere un mecanismo común como la reducción de especies

reactivas al oxígeno (ROS) que se observó en plántulas provenientes de semillas tratadas (Mastouri *et al.*, 2010). De forma similar, el tratamiento de inoculación de semilla de trigo con *Trichoderma* spp. tuvo un efecto positivo sobre la germinación y otros parámetros como biomasa en campo, aunque el efecto dependió del año (Xue *et al.*, 2017). En el cultivo de arroz se estudió *Trichoderma harzianum* y sus efectos sobre la emergencia y vigor de semillas de arroz a través de tratamiento de semillas y suelo. Los resultados mostraron un aumento en la emergencia, largo de tallo y raíz, peso fresco y seco de raíces (Khan *et al.*, 2005). Además, Cuevas *et al.* (2001) demostraron que *Trichoderma* fue tan efectivo como el fungicida químico propamocarb hydrochloride en el control del *damping off* de preemergencia, evaluado como porcentaje de germinación.

Por otro lado, se ha reportado un aumento del crecimiento vegetal en diferentes grupos de plantas, como tomate, lechuga, maíz, trigo, entre otros, por efecto de la asociación con *Trichoderma*, principalmente cuando la planta se encuentra en condiciones subóptimas debido a estrés biótico, abiótico o fisiológico. Algunos de los mecanismos propuestos para explicar la promoción del crecimiento vegetal son la síntesis de fitohormonas como auxinas y giberelinas, producción de vitaminas y ácidos orgánicos (glucónico, fumárico y cítrico) que pueden disminuir el pH del suelo y aumentar la solubilización y captación de fosfatos, magnesio, hierro y manganeso vitales para el metabolismo vegetal. Además, también se han detectado aumentos del sistema radicular y aumento de la tasa de metabolismo de los carbohidratos, fotosíntesis y mecanismos de defensa de las plantas (Stewart y Hill, 2014; Hernandez-Melchor *et al.*, 2019). Otros autores atribuyen la capacidad de promoción de crecimiento a una reducción en la producción de etileno, como consecuencia de la disminución de su precursor ACC (1-aminocyclopropano-1-ácido carboxílico), a través de la reducción de IAA (ácido indol acético) en la rizósfera y/o mediante actividad ACC desaminasa presente en *Trichoderma*. La reducción de etileno promueve el crecimiento vegetal mediante señales de giberelinas que aumenta la degradación de proteínas DELLA (Hermosa *et al.*, 2012). Además, *Trichoderma* produce IAA que estimula la biosíntesis de etileno, fitohormona relacionada a la defensa

de la planta. Dependiendo del momento *Trichoderma* controlará el desarrollo de la planta o la respuesta inmune (Hermosa *et al.*, 2012).

1.4. Producción y Formulación

1.4.1. Producción de *Trichoderma*

La producción tradicional de esporas de *Trichoderma* es mediante la utilización de un sustrato sólido, aunque algunas cepas también pueden ser producidas mediante fermentación líquida o bifásica.

La producción en sustrato sólido permite la producción de grandes volúmenes a bajos costos de operación, genera alta viabilidad de las esporas, facilidad en el manejo, y requiere menor consumo de energía y generación de efluentes, pero presenta algunas desventajas como son los largos tiempos de fermentación, sistema heterogéneo, escaso control de las condiciones de trabajo y limitaciones para el escalamiento a nivel industrial (Hernández Melchor *et al.*, 2019). Para lidiar con las limitaciones surge la fermentación en estado líquido como una alternativa promisorio, ya que es factible el escalado necesario para uso agroindustrial. Además, permite un control más estricto y automatizado de las condiciones de trabajo, mejor homogeneidad en la distribución de los nutrientes, calor y oxígeno, y un producto más uniforme. Por otro lado, puede haber un mayor riesgo de contaminación debido a la humedad, genera grandes cantidades de efluentes e implica un mayor costo de inversión inicial debido a los sistemas de monitoreo y control (Hernández Melchor *et al.*, 2019; Vázquez, 2010; Kobori *et al.*, 2015). Como sustrato para la obtención de propágulos del hongo pueden utilizarse residuos agroindustriales o productos agrícolas económicos y de fácil acceso como harinas, cereales, melaza, entre otros (Vasquez, 2010).

La producción industrial de *Trichoderma* en sustrato sólido y en medio líquido ha sido estudiada y optimizada para algunas cepas. Se destacan por ser procesos que permiten obtener buena producción de biomasa y esporas en diversos sustratos a bajos costos (Kobori *et al.*, 2015; Vasquez, 2010). Sin embargo, son pocas las cepas de *Trichoderma* que pueden ser multiplicadas eficientemente en medio

líquido, por lo cual la producción en medio de cultivo sólido suele ser la más utilizada (Kobori *et al.*, 2015).

1.4.2. Formulación

El desarrollo de productos para el control biológico depende de la identificación de un agente de biocontrol prometedor y la producción de propágulos con alta viabilidad de acción. Además, la producción debe ser económica, libre de contaminación, y un producto final con baja actividad de agua y larga vida útil. Por lo tanto, la producción y formulación del producto a base de *Trichoderma* debe hacerse de forma de garantizar la estabilidad del producto en el tiempo, desde la producción hasta la aplicación (Braga, 2019).

Existen más de 50 formulados de biofungicidas basados en cepas de *Trichoderma*, que constituyen el 60% de los hongos usados como biofungicidas (Fraceto *et al.*, 2018). Los formulados pueden contener diferentes estructuras del hongo, obtenidas por variados métodos. *Trichoderma* spp. producen tres tipos de propágulos que se pueden utilizar en formulaciones biofungicidas: hifas, clamidosporas y conidios. A pesar de las diferencias en la sobrevivencia entre conidios y clamidospora, ambos pueden soportar condiciones ambientales variables, por lo que son las más utilizadas. Las hifas tienen baja resistencia a la deshidratación, el cual es un proceso utilizado para prolongar la vida útil de los productos, por lo tanto, las hifas no son buenas candidatas para este proceso. Entre las técnicas de secado de microorganismos, la atomización es una de las más utilizadas, ya que presenta una deshidratación eficiente y de bajo costo en comparación con otros métodos (Braga, 2019).

Más allá de la búsqueda de cepas superiores, uno de los problemas asociados con los productos formulados con *Trichoderma*, líquidos y sólidos, es la baja viabilidad del agente biológico durante el almacenamiento y aplicación en el campo, ya que son microorganismos vivos y los factores climáticos afectan su sobrevivencia (Braga, 2019). Varias estrategias han sido sugeridas para superar estas limitantes, como el uso de mezclas de microorganismos, mejora fisiológica y genética de los mecanismos de biocontrol, manipulación de la formulación e integración sinérgica con otras estrategias de control que por sí solas pueden no ser efectivas (Singh *et al.*, 2012).

Herramientas basadas en microtecnología como el desarrollo de técnicas para el encapsulado de *Trichoderma* como ingrediente activo en diferentes matrices para el control de fitopatógenos y otros efectos benéficos sobre las plantas pueden resultar útiles para levantar las limitantes tecnológicas como bioinsumo. La microencapsulación ha surgido como un posible método para prolongar la vida útil, controlar la liberación del microorganismo, protegerlo de los agentes ambientales y así mejorar su desempeño (Braga, 2019). Se han realizado estudios con el fin de evaluar la conservación de esporas de *Trichoderma* deshidratadas y contenidas o no en gránulos, logrados mediante microencapsulado (Dos Santos *et al.*, 2015).

El uso de *Trichoderma* en forma de formulado con un adecuado compuesto como transportador hacia el blanco ha sido adoptado por investigadores e industrias para uso comercial. Este tipo de enfoque da como resultado la reducción del desperdicio de ACB, una adecuada adherencia a las superficies tratadas y sostenible actividad de control (Prasad *et al.*, 2020).

Los polímeros naturales como el quitosano, de naturaleza antimicrobiana y que se utilizan como inductores de defensa de las plantas, promotores del crecimiento y en el manejo de patógenos de las plantas, pueden explotarse como matriz para los sistemas de aplicación de ACB (Prasad *et al.*, 2020).

1.4.3. Microencapsulación

La microencapsulación es el proceso para obtener una capa protectora o una cápsula alrededor de un ingrediente activo, proporcionando una barrera física entre el compuesto del núcleo y los demás componentes del producto o el entorno externo. El compuesto activo queda envuelto en el agente encapsulante o disperso en una matriz que contiene al encapsulante. Este proceso puede mejorar notablemente la viabilidad de los microorganismos debido a su efecto protector. Es una técnica en la que las gotas de líquido, las partículas sólidas o los compuestos gaseosos quedan atrapados en películas finas, que pueden presentar una matriz homogénea o heterogénea (Braga, 2019; John *et al.*, 2010).

El material del núcleo y de la pared de las microcápsulas pueden estar compuestos por uno o varios ingredientes y la retención de éstos está determinada por su funcionalidad química, solubilidad,

polaridad y volatilidad (Braga, 2019). Entre los objetivos y beneficios de la microencapsulación de microorganismos, se pueden destacar: barrera contra la humedad y el oxígeno, reducción de la higroscopicidad del material del centro, fácil manejo y almacenamiento de productos, transformación de un compuesto líquido en polvo, protección de las células durante el proceso de secado, protección contra productos químicos, mejorando así el desempeño de los microorganismos (Braga, 2019).

El primer paso en la encapsulación es la dispersión e integración del microorganismo en una matriz líquida para posteriormente aplicar el proceso de microencapsulación seleccionado para la obtención del producto (John *et al.*, 2010). Los métodos para el microencapsulado pueden ser métodos químicos, fisicoquímicos o físicos, siendo el microencapsulado por *spray dryer* (SD) un método físico de costo relativamente bajo que permite el secado rápido y adecuado de grandes volúmenes de formulados de células microbianas sensibles, aplicando temperaturas relativamente altas con un mínimo impacto sobre la viabilidad de las células (Braga, 2019; Ixanicki *et al.*, 2021).

Las formulaciones secas de los bioinsumos generalmente alcanzan una vida útil que permite satisfacer los procesos de comercialización y aplicación en sistemas agrícolas, son fáciles de manipular y se pueden aplicar como dispersión o suspensión en agua en forma de *spray* o pulverización, lo cual es de gran interés para la industria agrícola (Ixanicki *et al.*, 2021). El proceso de secado evita el deterioro por contaminación e induce la dormancia de los conidios, hecho que favorece el desarrollo de formulación de productos (Braga, 2019).

Algunos compuestos utilizados para la microencapsulación son quitosano, dextrina, leche, celulosas, carbohidratos, gomas, proteínas y lípidos (Liu, C-P. y Liu, S-D., 2009; Shahidi y Han, 1993). Se han desarrollado sistemas de encapsulación de *Trichoderma* spp. en base a distintos materiales, por ejemplo: sacarosa, glicerol, molasa, goma arábiga, suero de leche, lactosa. Se destaca la maltodextrina (polisacárido que provee termo y osmoprotección a las células durante el calentamiento y el secado) como uno de los carbohidratos más utilizados (Jin y Custis, 2011; Braga, 2019).

La adecuada elección del agente encapsulante es fundamental para la eficiencia y estabilidad del microencapsulado. Los criterios para seleccionar el material de encapsulado se basan en la

compatibilidad, factores económicos y que no sean tóxicos (inocuidad para el cultivos, el ambiente y la alimentación humana). No siempre un solo compuesto posee todas las características deseadas, por esto, es posible usar una combinación de agentes encapsulantes (Estevinho *et al.*, 2013).

Un material de encapsulado ideal debe tener atributos tales como: baja viscosidad a altas concentraciones, fácil manejo, baja higroscopicidad (alta miscibilidad en agua), máxima protección al material del núcleo durante el secado, solubilidad en las soluciones utilizadas en el proceso, mantener la estabilidad del compuesto activo durante el almacenamiento, bajo costo y facilidad de obtención. Otra característica importante de los materiales de pared, principalmente para el uso en productos biológicos, es que no sean tóxicos para los cultivos, el ambiente y el consumo humano, ni reactivos con el material a ser encapsulado (Braga, 2019).

Los bioinsumos formulados en polvo pueden ser aplicados fácilmente sobre semillas o como formulados líquidos en el suelo. También se puede realizar aplicación foliar, asumiendo un riesgo mayor en su eficacia, debido a la influencia de los factores ambientales, como la luz, lluvia o viento (John *et al.*, 2010).

1.4.4. Microencapsulación por spray drying

El secado por aspersión (*spray drying*) es una tecnología de costo relativamente bajo, rápida, y reproducible, permitiendo el escalado del proceso, lo que justifica su preferencia al compararse con otras técnicas de microencapsulado. Es un proceso flexible, de fácil manejo y produce partículas de buena calidad. Una limitación de esta tecnología es que el agente encapsulante debe ser soluble en agua a un nivel aceptable (Estevinho *et al.*, 2013). El uso de agentes encapsulantes de baja solubilidad en agua provoca un aumento de la cantidad de agua a evaporar y una disminución en el contenido de humedad final, generando un proceso más caro y complicado (Estevinho *et al.*, 2013).

Es una operación unitaria por la cual un producto líquido, solución, emulsión o suspensión se atomiza en una corriente de gas caliente e instantáneamente se obtiene un polvo del material alimentado a la secadora, con valores de humedad entre 2% y 5% (Braga, 2019).

El proceso de *spray drying* (Figura 1) se puede resumir en cuatro pasos: 1) preparación y homogeneización de la solución de alimentación, 2) atomización del líquido en la cámara del secador, 3) deshidratación de la muestra por contacto con aire de secado, 4) separación y recogida de partículas sólidas (Braga, 2019).

El proceso de deshidratación se realiza normalmente de forma continua en el *spray dryer*, es decir, el líquido se bombea a la boquilla atomizadora que se inserta dentro de la cámara de secado, donde el líquido entra en contacto con el aire caliente. La evaporación del agua dentro de la gotícula se inicia por el gradiente de temperatura existente dentro de la cámara de secado, donde el aire caliente le transfiere calor a las gotículas formadas. Dicha transferencia genera un aumento de temperatura de las gotículas y desencadena la evaporación del agua. El proceso de secado se da por finalizado cuando la temperatura de la gotícula se iguala a la temperatura del aire de secado (Braga, 2019). El material sólido seco se separa del aire mediante pasaje por un ciclón. El producto obtenido es un polvo fino, normalmente con baja humedad.

Con la reducción de la humedad se consigue mayor estabilidad del producto a lo largo del tiempo, disminuye el volumen final facilitando el almacenamiento y se reduce el riesgo de contaminación microbiológica y degradación química (Braga, 2019).

El tiempo de exposición de las micropartículas a las altas temperaturas es corto, normalmente pocos segundos, y la temperatura en el centro de ellas generalmente no supera los 100°C, reduciendo la posibilidad de provocar cambios en compuestos termo sensibles. Esto permite la aplicación de SD, por ejemplo, a compuestos como la vitamina C usando un agente encapsulante como el quitosano sin tener pérdidas significativas (Estevinho *et al.*, 2013).

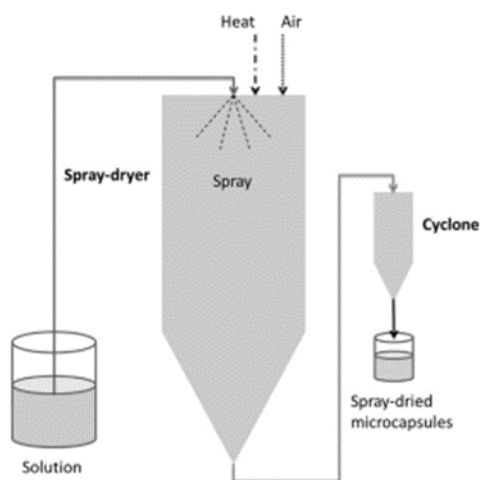


Figura 1. Diagrama esquemático del proceso de *spray drying*

Las características y calidad del producto obtenido dependen de las condiciones de trabajo del proceso, como la temperatura de entrada y salida del aire de secado, velocidad y caudal de aire y alimentación de muestra. Otra variable importante para considerar es el contenido de sólidos y la viscosidad de la muestra a deshidratar. Altos valores de sólidos hacen más difícil el proceso de secado, sin embargo, bajo contenido de sólidos aumenta el consumo de energía necesario para evaporar el contenido de agua. Por lo tanto, es fundamental la optimización de dichas variables (Estevinho *et al.*, 2013). Las condiciones ideales de trabajo se obtienen por una combinación adecuada de altas temperatura de aire, alto contenido de sólidos de solución y fácil pulverización y secado sin daño del producto final (Estevinho *et al.*, 2013).

Estudios de encapsulación de hongos han demostrado que el producto de *spray drying* de conidios aéreos puede ser altamente viable luego del proceso pero que su viabilidad se puede ver disminuida con el aumento de la temperatura de salida. Además, se ha demostrado que la sobrevivencia del material fúngico está inversamente relacionado con la temperatura de almacenamiento y la humedad del producto en polvo obtenido (John *et al.*, 2010). Estas variables junto a la temperatura de ingreso al equipo de secado y la velocidad de flujo del producto, son puntos críticos que controlar para un mejor resultado (Braga, 2019).

Es de fundamental importancia el estudio de la viabilidad microbiana y humedad post secado, siendo que temperaturas muy elevadas pueden causar daños a la membrana del conidio y temperaturas bajas

pueden no ser suficientes para el secado. Por esto, es importante trabajar en la optimización de las condiciones del proceso de SD con el objetivo de obtener un producto final en polvo de características adecuadas (Braga, 2019).

El desarrollo de formulaciones en polvo de *Trichoderma* con maltodextrina como material encapsulante confirmaron que la temperatura de ingreso de aire de secado afecta significativamente la sobrevivencia de conidios, causando efectos negativos sobre el porcentaje de sobrevivencia y de conidios viables cuando aumenta por encima de 100°C, siendo menores los efectos ante la variación de concentración de maltodextrina (Braga, 2019).

1.5. Quitosano

El quitosano es un biopolímero natural de amplia aplicación en la agricultura, donde se lo ha usado como compuesto antifúngico. Es un derivado parcialmente N-desacetilado de la quitina, con mejores propiedades en cuanto a reactividad y solubilidad. La quitina es el biopolímero más abundante después de la celulosa, se puede encontrar formando la estructura de paredes celulares de los hongos y el exoesqueleto de artrópodos y crustáceos (Marmol, 2011; Kappel y Grubel, 2020).

El quitosano es principalmente producido por desacetilación química o enzimática de quitina a partir del caparazón de crustáceos (Zabala-González *et al.*, 2016). Se ha descrito como un polímero catiónico lineal, biodegradable, de alto peso molecular, de fácil aplicación y ambientalmente amigable (Marmol, 2011). Su estructura le permite moldearse fácilmente en varias formas, lo cual lo hace un material candidato como matriz para formulación de principios activos. Esta característica junto a sus propiedades bioactivas le permiten desempeñar un doble papel en los procesos de formulación (Ravi Kumar, 2000).

Es un compuesto no tóxico a la mayoría de los organismos superiores. Incluso, en las plantas mejora la resistencia y reduce las enfermedades fúngicas. El quitosano y los quito-oligosacáridos muestran actividad antibiótica contra bacterias, levaduras y algunos hongos filamentosos (Zabala-González *et al.*, 2016). El quitosano ha demostrado ser eficaz contra varios fitopatógenos y aumentar significativamente el crecimiento de las plantas. Existen evidencias de que en tratamiento de semillas

se comporta como un elicitador de resistencia, induciendo un mejoramiento de la capacidad defensiva en plántulas y plantas, potenciando las defensas innatas de éstas (Bhaskara Reddy *et al.*, 1999; Boonlertnirun *et al.*, 2008). Recientemente se ha estudiado la actividad antimicrobiana del quitosano y se ha demostrado que tiene la capacidad de inhibir y matar una amplia variedad de microorganismos. Además, presenta una menor toxicidad sobre células de mamíferos en comparación con los productos químicos (Kheiri *et al.*, 2016).

Se han propuesto tres mecanismos como explicación al modo de inhibición. El primer mecanismo supone que la membrana plasmática de los hongos es el objetivo principal del quitosano. Su carga positiva le permite interactuar con los componentes de carga negativa de la membrana fúngica, lo que aumenta la permeabilidad de la membrana y provoca la fuga del contenido celular y posteriormente conduce a la muerte celular. El segundo mecanismo propone que el quitosano actúa como un agente quelante al unirse a los elementos traza causando que los nutrientes esenciales no estén disponibles para el crecimiento normal de los hongos. Finalmente, el tercer mecanismo propone que el quitosano puede penetrar la pared celular de los hongos y unirse al ADN. Esto inhibirá la síntesis de ARNm y por lo tanto afectará la producción de proteínas y enzimas esenciales (Kheiri *et al.*, 2016).

El quitosano produce distintos efectos sobre *Trichoderma spp.* Algunas cepas muestran una mejora en sus propiedades antifúngicas, aumento en la producción de quitosanasa y mayor crecimiento, mientras que otras se pueden mostrar más sensibles (Zavala-González *et al.*, 2016). Da Silva *et al.* (2010) indicaron que el quitosano en contacto con *Trichoderma* puede actuar como inductor o como inhibidor en la producción de quitosanasa dependiendo de las cantidades de quitosano presente.

El uso de quitosano en combinación con *Trichoderma* se presenta como una posible alternativa para el recubrimiento de semillas, puede conducir a una mejor germinación y viabilidad de semillas, mejorar el vigor de la planta y mejorar el manejo de enfermedades mediante una posible acción sinérgica contra los patógenos invasores. El *film* que forma el quitosano puede dar una protección física a la semilla y su permeabilidad permite un intercambio óptimo de vapor y gases para una germinación saludable que resulta en un mejor soporte de la planta. Por lo tanto, este *film* puede

proteger a las semillas y al biocontrolador del estrés exterior (Prasad *et al.*, 2020; Chandrika *et al.*, 2019). Sin embargo, el quitosano puede resultar nocivo para cepas de *Trichoderma* debido a su acción antifúngica, lo que conlleva a la necesidad de conocer la relación entre cepas de *Trichoderma* y quitosano.

En el presente trabajo, se utilizó quitosano a partir del producto comercial Biorend®. Este es un producto de origen chileno, descrito por el fabricante como bioestimulador natural que mejora la implantación, la masa radicular, induce la resistencia sistémica adquirida (SAR) disminuyendo la incidencia de enfermedades y aumentando los kg a cosecha. Según la ficha técnica, el ingrediente activo de este producto comercial es el quitosano, y su concentración es 2,5%.

Existen estudios con aplicación conjunta de *Trichoderma harzianum* (TRICHOSOIL®) y quitosano (Biorend®) sobre plantas de *Eucalyptus grandis*, ejerciendo un control positivo sobre las enfermedades más comunes presentes en vivero, tales como *Alternaria*, *damping off* y *Botrytis*. Además, se observó un efecto positivo sobre el crecimiento de algunos de los genotipos de *E. grandis* evaluados (Olivera y Rodríguez, 2014).

Existen métodos para calcular el efecto esperado de combinaciones de controladores en comparación con el efecto de los componentes individuales. Uno muy comúnmente usado es el método “Bliss Independence” (Xu *et al.*, 2011). Este método asume que ambos controladores actúan a través de mecanismos independientes, y por lo tanto su uso combinado es representado por la unión de dos eventos probabilísticamente independientes. El desarrollo esperado de enfermedad para el combinado (D12) se calcula como el producto de efectos individuales (ej., $D12 = D1 \times D2$). Si asumimos que la eficacia del tratamiento se define como $E12 = 1 - D12$, entonces $1 - E12 = (1 - E1) \times (1 - E2)$. Simplificando se obtiene la fórmula comúnmente usada en estudios de sinergia con mezcla de fungicidas y ACB: $E12 = E1 + E2 - (E1 \times E2)$ (Xu *et al.*, 2011; Jambhulkar *et al.*, 2018).

La sinergia es calculada usando el denominado Factor de Sinergia: $(SF) = E(\text{obs}) / E(\text{esp})$, donde $E(\text{obs})$ = control observado por la mezcla; $E(\text{esp})$ = control esperado por la mezcla. Cuando $SF = 1$, la interacción entre los agentes de control es aditiva, cuando $SF < 1$, la interacción es antagonista, y

cuando $SF > 1$, la interacción es sinérgica, es decir, la eficacia de control observado es mayor al esperado (Xu *et al.*, 2011; Jambhulkar *et al.*, 2018).

2. HIPOTESIS

Es posible formular esporas de *Trichoderma* con quitosano como elemento encapsulante, utilizando microtecnologías que aseguren viabilidad del agente activo, extensión de su vida útil, y facilidad de incorporación a prácticas agrarias, asegurando el mantenimiento de las funciones de protección y promoción del crecimiento vegetal por las que la cepa fue originalmente seleccionada.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

El objetivo general del presente trabajo es desarrollar una microtecnología aplicable a cepas locales de *Trichoderma* spp., seleccionadas por su capacidad para el control biológico y/o la promoción del desarrollo vegetal. Además, validar su aplicación en cultivos de alto interés económico, de forma de maximizar la respuesta de los cultivos a las propiedades benéficas de estas cepas, mejorando la sustentabilidad del sistema.

3.2. Objetivos Específicos

- Obtener cepas de *Trichoderma* con capacidad de promocionar el crecimiento vegetal en trigo y arroz.
- Obtener cepas con capacidad antagonista contra patógenos de ambos cultivos.
- Obtener cepas compatibles y/o de acción sinérgica con quitosano, polímero utilizado para la microencapsulación.
- Obtener un prototipo de formulado de esporas encapsuladas en quitosano
- Aumentar la emergencia de las semillas tratadas con el formulado, así como el desarrollo vegetativo y sanidad de las plantas obtenidas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Hongos patógenos y cepas de *Trichoderma*

En arroz, los patógenos evaluados fueron cepas de *Nakataea oryzae* y *Rhizoctonia oryzae-sativae* provistas por el Dr. Sebastián Martínez (INIA Treinta y Tres) y conservadas en la colección INIA Las Brujas (ILB425 e ILB427). Las cepas de *Trichoderma* incluyeron nueve cepas aisladas como endófitas de plantas de arroz o de suelos de cultivos de arroz de INIA Treinta y Tres provistas por la Dra. Sandra Lupo (Facultad de Ciencias, UdelaR) y el Dr. Sebastián Martínez y conservadas en la colección INIA Las Brujas (ILB394, ILB395, ILB396, ILB397, ILB404, ILB409, ILB412, ILB416 e ILB421) y tres cepas disponibles comercialmente (ILB423, ILB424 y K).

Todas las cepas de trabajo se encontraban almacenadas en la colección de INIA Las Brujas, en tubos con PDA (Agar Papa Dextrosa) a 4°C.

Los patógenos de trigo usados fueron cepas de *Fusarium graminearum sensu stricto*, F02020 y F09005 que afectan la espiga y la implantación, provistas por la Dra. Silvia Pereyra (INIA La Estanzuela). Las cepas de *Trichoderma* evaluadas en trigo fueron las cepas TME y T1C identificadas como *Trichoderma atroviride* y *T. koningiopsis* respectivamente, aisladas a partir de rastrojos de trigo de INIA La Estanzuela, previamente evaluadas y seleccionadas por su eficiencia en el control biológico de *Fusarium* (Cabrera, 2009) provistas por la Dra. Silvana Vero (Facultad de Química, UdelaR) y la Dra. Silvia Pereyra (INIA).

4.2. Caracterización de aislados de *Trichoderma*

4.2.1. Promoción de crecimiento

La promoción de crecimiento vegetal se evaluó en invernáculo mediante ensayos de inoculación de semilla y posterior evaluación del peso seco de la planta.

Para la preparación del inóculo se sembró cada cepa de *Trichoderma* en placas de PDA y se incubó a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 días. Posteriormente se cosecharon las esporas en una solución salina (0,85% NaCl) con tween 80 (0,02%). La concentración de esporas/mL correspondiente a cada suspensión se

calculó mediante el recuento en cámara de Neubauer. Adicionalmente se estudió la viabilidad, a través de la evaluación de germinación de las esporas en PDA luego de 16 horas incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Finalmente se prepararon las suspensiones de esporas a una concentración de 1×10^6 esporas/mL.

Se inocularon 4 semillas por maceta a una dosis de 1 mL por semilla y un total de 10 macetas por tratamiento, utilizando arena, vermiculita y turba como sustrato en relación 3:2:1. Luego de 15 días se registró el número de semillas germinadas y se conservaron sólo 2 plántulas por maceta, conservando las de crecimiento más homogéneo.

Transcurridos 60 días, se cosechó la parte aérea y se secó en estufa a 65°C hasta peso constante. Finalmente se pesó la biomasa aérea.

Para el cultivo de arroz se evaluaron 11 cepas de *Trichoderma*, mientras que en plantas de trigo se evaluaron 6 cepas. En ambos casos se realizó un control inoculando con agua.

Se utilizaron semillas de arroz del cultivar INIA Tacuarí y semillas de trigo cultivar INIA Génesis 4.33.

El análisis de los datos de peso seco de parte aérea se realizó usando el software R versión 4.1.0 (R Core Development Team, 2021). Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y posterior comparación de medias con el Test de Fisher de “Least Significant Difference” (LSD) ($p > 0,05$).

4.2.2. Control biológico

Se realizaron ensayos *in vitro* con el fin de verificar la actividad antagonista de las cepas de *Trichoderma* sobre dos cepas de *Fusarium graminearum* y dos cepas patógenas de arroz de las especies *Nakataea oryzae* y *Rhizoctonia oryzae-sativae*.

Se aplicó la técnica de cultivos duales en placas de Petri con medio PDA, mediante la siembra de un disco de micelio del antagonista y del patógeno enfrentados en bordes opuestos de la placa.

Los discos, de 5 mm de diámetro, se obtuvieron de cultivos puros en crecimiento a 25°C en PDA. Como control se sembró en una placa un disco de patógeno sin oposición. Las placas se incubaron en estufa a 25°C y se midió el diámetro de crecimiento diariamente hasta que el patógeno cubrió la placa control. A partir de los valores obtenidos se calculó el % de inhibición del radio de crecimiento del hongo patógeno:

$$\%inhibición = \frac{(Radio\ patógeno\ control - Radio\ patógeno\ en\ cultivo\ dual)}{Radio\ patógeno\ control} * 100$$

Para la expresión de resultados se consideraron los valores tomados en dos ensayos independientes, evaluando 2 réplicas de cada tratamiento en cada uno de ellos.

El análisis de los datos de crecimiento en la oposición *Trichoderma* y patógenos se realizó usando un modelo lineal generalizado, asumiendo distribución Gaussiana. Para la comparación de medias de tratamiento se usó LDS Test ($p > 0,05$). Los análisis estadísticos fueron hechos con el software R versión 4.1.0 (R Core Development Team, 2021).

4.2.3. Compatibilidad *Trichoderma* – Agente encapsulante

Se realizaron ensayos *in vitro* con el fin de evaluar la compatibilidad de los aislamientos con el polímero a utilizar en el proceso de microencapsulado. Se evaluó germinación y crecimiento de cepas de *Trichoderma* en medio PDA y Agar Agua (AA) suplementados con quitosano.

Se usó quitosano disponible en agropecuaria bajo el nombre comercial Biorend® (25 g/L) de fácil disponibilidad. En base a la concentración de quitosano en este producto (2,5%) se calculó la cantidad de Biorend® necesaria para lograr los valores de quitosano indicados en cada ensayo. Por lo tanto, en la tesis cuando se habla de quitosano se refiere a este compuesto mediante aplicación de Biorend®.

4.2.3.1. Germinación

La viabilidad de los aislados de *Trichoderma* al ser expuestos al quitosano se determinó a través del porcentaje de germinación. Para esto, se cosecharon esporas de las cepas de *Trichoderma* en solución salina (0,85%) + tween 80 (0,02%), a partir de placas de PDA incubadas durante 10 días. A partir de la suspensión de esporas se sembró una alícuota de 100 µl en las placas conteniendo PDA y AA suplementadas con quitosano para evaluar la germinación.

Los ensayos se realizaron en placas con medio AA y PDA con el quitosano a concentraciones de 0,03%, 0,07%, 0,1% (p/v) y medio de cultivo puro como control.

Luego, las placas fueron incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 16 horas y se realizó el recuento de esporas germinadas como indicador de viabilidad y compatibilidad. Se realizaron 3 conteos por placa y 2 repeticiones del ensayo independientes.

El análisis de datos se realizó con el software R versión 4.1.0 (R Core Development Team, 2021). Se evaluaron los resultados obtenidos usando un modelo lineal generalizado, asumiendo distribución Binomial, con ajuste quasi-Binomial en caso de ser necesario. Se aplicó el Test HSD (“Honestly significant difference”) de Tukey ($p > 0,05$) para la comparación de medias entre tratamientos.

4.2.3.2. Crecimiento

El efecto del quitosano sobre el crecimiento radial de los aislados de *Trichoderma* se evaluó en placas de Petri con medio PDA y AA suplementados con quitosano al 0,03, 0,07 y 0,1%, mientras que como control se utilizó medio de cultivo sin suplementar.

Se inoculó en el centro de cada placa un *plug* de agar extraído de una colonia de *Trichoderma* con 7 días de crecimiento en PDA. Posteriormente se incubó a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y se midió diariamente el diámetro de crecimiento en cada placa hasta que en la placa control alcanzó el borde.

Se realizaron 3 réplicas de cada tratamiento, y el experimento se repitió un total de 2 veces.

El porcentaje de crecimiento fue calculado como:

$$\%Crecimiento = \frac{\text{crecimiento en medio con quitosano}}{\text{crec.placa control}} * 100$$

Los datos de crecimiento obtenidos se analizaron usando el software R versión 4.1.0 (R Core Development Team, 2021). Se realizó análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó transformación log de datos cuando fue necesario. Para el análisis post hoc se aplicó el Test HSD Tukey ($p > 0,05$).

4.2.3.3. Efecto del cambio en el pH debido a la suplementación de quitosano

La suplementación de quitosano generó un cambio de pH al medio de cultivo, por lo tanto, se realizaron ensayos para evaluar si el efecto sobre la germinación de las cepas de *Trichoderma* fue dado únicamente por el quitosano o si además la variación en el pH incidió en la variable de estudio.

Se midió el valor de pH alcanzado por cada medio PDA suplementado con quitosano a distintas concentraciones (sección 4.2.3.1) y en paralelo se realizó un ensayo en que se suplementó medio de

cultivo PDA con ácido láctico de manera de obtener PDA con pH iguales a los alcanzados por la adición de quitosano. Se determinó la germinación en PDA a pH 5,28, 4,92, 4,72 y 4,70 siguiendo la metodología descrita en la sección 4.2.3.1.

4.2.3.4. Sinergia *in vitro* del uso combinado de *Trichoderma* y quitosano para el control biológico

Nuevamente se aplicó la técnica de cultivos duales enfrentando *Trichoderma* y los fitopatógenos *Fusarium* F09005 y F02020, *Nakataea oryzae* FP1 (ILB425) y *Rhizoctonia oryzae sativa* FP4 (ILB427).

El medio de cultivo PDA fue suplementado con quitosano al 0,07% con el objetivo de evaluar cómo se afecta la capacidad de control de las cepas de *Trichoderma* sobre los patógenos al estar ambos en contacto con el quitosano, en vistas a su uso propuesto como agente encapsulante para la formulación.

El patógeno fue inoculado con un *plug* de agar de 5mm sobre un borde. En el lado opuesto de la placa, como se muestra en el esquema (Figura 2), se inoculó una alícuota de 20 µL de suspensión de *Trichoderma* de concentración 1×10^6 esporas/mL.



Figura 2. Esquema de ensayos. P: patógeno / T: *Trichoderma*.

La evaluación se basó en la medición del crecimiento radial del patógeno, hasta que se completó el crecimiento en la placa control (patógeno en PDA puro).

Para el análisis de datos se aplicó un modelo lineal generalizado, asumiendo distribución Gaussiana, utilizando el software R versión 4.1.0 (R Core Development Team, 2021). La comparación de medias se realizó aplicando el Test de Fisher de LSD ($p > 0,05$).

Además, se analizó el efecto conjunto del quitosano y el *Trichoderma* en comparación con la capacidad de control de éstos individualmente. Para esto se calculó la sinergia con el método de “Bliss Independence” (Xu *et al.*, 2011).

El % esperado de control del uso combinado de ambos componentes quedó expresado como: $\%Cesp = A + B - (AB/100)$, donde A y B son los niveles de control dados por cada elemento de forma

independiente. Se utilizó el indicador factor de sinergia, como $SF = Cobs/Cesp$, si %Cobs (% de control observado del uso combinado) es mayor a %Cesp, entonces $SF > 1$, se puede decir que existe una interacción sinérgica entre ambos controladores. Si son iguales, $SF = 1$, la interacción se considera aditiva y si %Cobs < %Cesp ($SF < 1$) se la define como interacción antagónica.

4.2.4. *Multiplicación en medio sólido*

4.2.4.1. Producción de *Trichoderma* en arroz

La producción de *Trichoderma* en medio sólido se realizó siguiendo el método descrito por Abreo *et al.* (2019). El sustrato sólido fue arroz parboiled SAMAN®. Se prepararon bolsas esterilizables con 100 g de arroz humedecido en 100 mL de agua tibia. Luego de la absorción del agua, las bolsas se cerraron con tapón filtro para permitir el intercambio de gases. Posteriormente fueron esterilizadas en autoclave, se llevaron a temperatura ambiente y se inocularon con 10 mL de suspensión de conidios de concentración 1×10^6 conidios/mL y se incubaron a 25°C durante 12 días.

Finalmente se recolectó el contenido total de cada bolsa en botellas con 400 mL de agua. Las botellas se agitaron por 20 minutos para asegurar la separación de esporas, y posteriormente se filtraron a través de una gasa estéril para obtener las suspensiones de esporas libres de arroz. La concentración de la suspensión se determinó en cámara de Neubauer y el rendimiento se expresó como número de esporas/g de arroz seco.

4.2.4.2. Producción de *Trichoderma* en arroz suplementado con quitosano

Para evaluar si el uso de sustrato sólido suplementado con quitosano mejoraba el rendimiento en la producción de esporas se siguió una metodología similar a la descrita anteriormente. Se prepararon bolsas esterilizables con 50 g de arroz humedecido en 50 mL de agua tibia. Se dejó absorber el agua y se cerraron con tapón filtro.

Luego de la esterilización y a temperatura ambiente se inoculó cada bolsa con 5 mL de una suspensión de agua con quitosano a distintas concentraciones. Las concentraciones usadas de quitosano fueron 0,015%, 0,03% y 0,06% (p/p) y cada tratamiento se realizó por duplicado. Una vez absorbido el líquido,

se inoculó cada bolsa con 1mL de suspensión de *Trichoderma* de 1×10^8 conidios/mL y se incubaron a 25°C durante 12 días.

Cumplido el período de incubación se realizó la cosecha utilizando 200 mL de agua por bolsa. Finalmente se determinó la concentración de esporas obtenidas y el rendimiento como número de esporas/g de arroz seco. El ensayo completo se repitió un total de tres veces.

El análisis de datos se evaluó utilizando el software R versión 4.1.0 (R Core Development Team, 2021). Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) sobre los resultados de producción de esporas/g de arroz seco y posteriormente se realizó la comparación de medias aplicando el Test HSD Tukey ($p > 0,05$).

4.3. Producción del formulado

La producción del formulado se realizó con la cepa ILB397 (*Trichoderma asperelum*), la cual mostró los mejores resultados en las actividades evaluadas, es decir la más beneficiosa para los fines del presente trabajo.

Para la formulación se utilizó el equipo *spray dryer* BUCHI B.290, donde la suspensión de agente encapsulante y esporas fue atomizada y deshidratada formándose en simultaneo la cápsula protectora en torno a las esporas.

4.3.1. Selección de agentes encapsulantes

Para el encapsulado se usó el quitosano, polímero natural compatible y sinérgico con la cepa ILB397 para el control de los patógenos. Se usó el producto comercial Biorend[®] (25 g de quitosano/L).

El quitosano es además conocido por su capacidad adherente sobre las superficies. Este compuesto se usó en conjunto con polietilenglicol 6000 (PEG), polímero sintético, biodegradable y soluble en agua que actúa como protector de esporas de *Trichoderma* (Chandrika *et al.*, 2019). También se agregó maltodextrina, polisacárido que proporciona osmoprotección y protección térmica a las células durante el calentamiento y secado (Braga, 2019). La maltodextrina, adicionada al 10%, aporta también gran cantidad de sólido que actúa como material de soporte.

4.3.2. Preparación de la suspensión

Para las pruebas en el equipo *spray dryer* BUCHI B.290, se utilizó un volumen de suspensión a secar de 80 mL.

El primer paso fue la agitación de una solución de quitosano y PEG en agitador orbital a un régimen de 200 rpm y 60°C, la solución contenía 48 mL de Biorend y 0,415 gramos de PEG (valores calculados para obtener una concentración de 1,5% de quitosano y 0,5% de PEG en la suspensión final a deshidratar de 80 mL). Se dejó en agitación durante la noche (17 horas), obteniendo como resultado un “film” entre los elementos. Luego de alcanzar temperatura ambiente, se agregaron 20 mL de suspensión de esporas de *Trichoderma* previamente producido en sustrato sólido y almacenado a 4°C (sección 4.2.4), con una concentración $> 5 \times 10^8$ esporas/mL. El contenido total de esporas en la suspensión final a deshidratar fue aproximadamente 10^{10} esporas. Luego se agregaron 8 gramos de maltodextrina disueltos en 12 mL de agua, para alcanzar los 80 mL finales, y se mezcló mediante agitación en agitador orbital a 150 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente, obteniendo así el producto a deshidratar (Chandrika *et al.*, 2019). La composición de la suspensión a deshidratar fue de 10^{10} esporas, 1,5% de quitosano, 0,5% de PEG y 10% de maltodextrina.

Previo a la deshidratación en el equipo *spray dryer* BUCHI B.290 se tomó una muestra y se determinó la concentración de esporas (esporas/mL) y la viabilidad de las esporas en suspensión (% Germ). Para determinar la germinación de esas esporas en la suspensión, se sembraron 50 μ L de una dilución 1/100 de la suspensión en medio PDA, que se incubó por 16 horas y que finalmente se evaluó la germinación mediante observación cuantitativa en el microscopio. La concentración de esporas fue determinada mediante recuento en la cámara de Neubauer.

4.3.3. Selección de las condiciones de trabajo del Spray-dryer

Las variables para controlar en el secado por atomización del *spray dryer* fueron el porcentaje de aspiración, la velocidad del flujo de suspensión (% de la bomba), la temperatura de ingreso, y el flujo de aire para pulverización. El porcentaje de aspiración y la velocidad de flujo de aire se mantuvieron fijos (100% y 35 mm $\sim$ 414 L/h respectivamente), y se trabajó variando el porcentaje de bomba y

temperatura de ingreso. Estas dos condiciones se fueron variando en busca de valores de humedad y germinación de las esporas adecuados en el producto seco final, determinando como objetivo inicial obtener una humedad ~ 0,3 en valor de aw y viabilidad $\geq 70\%$.

Al momento de ajustar las condiciones de trabajo fue importante considerar que un aumento en la temperatura de ingreso genera un aumento proporcional en la temperatura de egreso y disminuye la humedad en el producto de salida. Mientras que un aumento en el flujo de entrada (mayor % de bomba) genera un efecto contrario: disminución en la temperatura de salida y aumento de la humedad en el producto final.

4.3.4. *Recolección y análisis del formulado*

Una vez finalizado el proceso de secado, se recolectó el formulado y se registraron los gramos obtenidos, humedad del producto, concentración de esporas y viabilidad.

La humedad se midió utilizando el equipo Aqualab®, estimando la humedad en valores de actividad de agua (aw). A partir del producto seco obtenido, se tomaron 0,3 gramos y se suspendieron en 3 mL de agua. Con dicha suspensión se realizó el recuento de esporas en cámara de Neubauer (esporas/mL) y se evaluó la viabilidad, medida en porcentaje de esporas germinadas (%Germ.). Para esto se sembraron 50 μ L de una dilución 1/10 de la suspensión inicial en medio PDA, se incubó por 16 horas y finalmente se evaluó la germinación mediante observación en el microscopio.

Considerando la cantidad de producto obtenido, concentración de esporas y porcentaje de germinación se calculó el valor de esporas viables/g de formulado. Además, se calcularon los porcentajes de sobrevivencia de esporas (%Sob.), el porcentaje de esporas recuperadas (%E.recup) y el porcentaje de esporas viables recuperadas (%E.v.recup)

Las ecuaciones para los cálculos se presentan a continuación.

$$X \frac{\text{Esporas}}{\text{g de formulado}} = Y \frac{\text{esporas}}{\text{mL}} * \frac{3 \text{ mL}}{0,3 \text{ g}}$$

$$\% \text{Sobrevivencia} = \frac{\text{esporas viables}}{\text{esporas viables preSD}}$$

$$\text{esporas viables} = X \frac{\text{esporas}}{\text{g formulado}} * Y \text{ g formulado} * \frac{\% \text{Germinación}}{100}$$

$$\text{esporas viables preSD} = X \frac{\text{esporas}}{\text{mL}} \text{ en solución preSD} * \frac{\% \text{Germ.preSD}}{100} * 80 \text{ mL}$$

$$\% \text{Esporas recuperas} = X \frac{\text{esporas}}{\text{g formulado}} * Y \text{ g formulado} * \frac{100}{Z \frac{\text{esporas}}{\text{mL}} \text{ preSD} * 80 \text{ mL}}$$

$$\% E. \text{ viables resuperadas} = \frac{\text{esporas viables} * 100}{\text{esporas viables preSD}}$$

El producto final se envasó al vacío para su almacenamiento a 24°C y 4°C. Posteriormente se realizó un seguimiento de viabilidad mensual.

4.3.5. Microscopía electrónica de barrido

Se observó el formulado obtenido, sus componentes y la superficie de semillas inoculadas en Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), mediante el servicio brindado por la M. Sc Ana Laura Reyes en Laboratorio de Facultad de Ciencias, Udelar.

4.4. Actividad del formulado en planta

Una vez que se obtuvo el formulado, se realizaron bioensayos en plantas con el fin de verificar que se mantuviera la actividad promotora del crecimiento y biocontroladora del *Trichoderma* luego de su formulación.

4.4.1. Efecto del formulado sobre la germinación de semillas

4.4.1.1. Efecto del formulado sobre la germinación de semillas de trigo

Se observó que la concentración del formulado seleccionada inicialmente para los ensayos (3x10⁸ e/mL) afectaba negativamente la germinación de semillas de trigo inoculadas. Por lo tanto, con el objetivo de determinar la concentración del formulado adecuada y evitar efectos negativos en la germinación se realizaron ensayos en invernáculo inoculando semillas con distintas concentraciones de formulado. De esta forma, quedó determinada la concentración de esporas/mL que finalmente fue usada para los ensayos posteriores.

Para la preparación de inóculo se utilizó formulado con $3,2 \times 10^9$ esporas/g con una viabilidad del 70% obtenido a partir del secado en *spray dryer* de una suspensión con quitosano al 1,5%, PEG 0,5%, maltodextrina 10% y *Trichoderma* (3×10^{10} esporas, cosechado de arroz suplementado con 0,015% de quitosano).

En el segundo ensayo se utilizó un formulado con $6,5 \times 10^8$ esporas/g con una viabilidad del 72%. Los gramos de producto en polvo a rehidratar en agua se calcularon considerando la concentración de esporas/g del formulado, el volumen final a ser usado y la concentración final de solución inoculante deseada. Se utilizó una relación de 0,4 mL de suspensión por gramo de semilla (50 semillas). La cantidad de formulado calculada para obtener la concentración de esporas deseada se rehidrató en un frasco con agua y allí se adicionaron las semillas, se mezcló y posteriormente se realizó la siembra. Se implementaron 6 tratamientos que se describen a continuación:

T1- Formulado [Alta]: Concentración del inóculo alta, 3×10^8 esporas/mL. Se espera se peguen en el orden de 10^5 esporas/semilla.

T2- Formulado [Media]: solución inoculante e impregnación de semillas un orden menor a T1 (3×10^7 esporas/mL).

T3- Formulado [Baja]: solución inoculante e impregnación de semillas un orden menor a T2 (3×10^6 esporas/mL).

T4- *Trichoderma* sin formular: suspensión de esporas frescas de *Trichoderma* sin formular. Concentración de esporas e impregnación en semillas un orden menor a T2 (3×10^6 esporas/mL).

T5- Quitosano: Inoculación de semillas con quitosano (Biorend®) a una concentración igual a la obtenida teóricamente en T3.

T6- Control: Tratamiento control, inoculación de semillas con solución de agua.

Se inocularon un total de 96 semillas por tratamiento, sembrando 32 semillas por cada uno de los 3 bloques. El ensayo se repitió un total de dos veces. En la Figura 3 se muestra un bloque con los 6 tratamientos.

El efecto provocado por los distintos tratamientos sobre la germinación de semilla se evaluó a partir del día 7, mediante el recuento de semillas germinadas por tratamiento.

El análisis de datos de germinación fue realizado usando un modelo lineal generalizado, asumiendo distribución Poisson, con ajuste quasi-Poisson en caso de ser necesario. Para la comparación de medias de tratamiento se utilizó LSD Test ($p>0,05$). Los análisis estadísticos fueron hechos con el software R versión 4.1.0 (R Core Development Team, 2021).



Figura 3. Aspecto de un bloque con distribución al azar de los tratamientos. Cada bandeja contenía 32 celdas con el sustrato, en cada una de ellas se sembró una semilla de un mismo tratamiento, en cada bloque se ubicó una bandeja de cada tratamiento distribuidas aleatoriamente. Se realizaron 3 bloques por ensayo, totalizando 96 semillas por tratamiento. El ensayo se realizó dos veces.

4.4.1.2. Efecto del formulado sobre la germinación de semillas de arroz en invernáculo

Debido a que la germinación de las semillas de arroz en condiciones de invernáculo con sustrato artificial (arena, vermiculita y turba proporción 3:2:1) fue cercana al 100% para todos los tratamientos (semillas inoculadas con formulado, con esporas frescas de *Trichoderma* sin formular y control), se decidió analizar la germinación de semillas en suelo obtenido de plantaciones de arroz, donde se espera una reducción en la germinación por efecto de los patógenos allí presentes que permita evidenciar el efecto de los tratamientos.

Se realizaron ensayos en la estación de INIA Treinta y Tres a cargo de Sebastián Martínez y personal de apoyo. Fueron dos ensayos independientes, en invernáculo, utilizando suelo arrocero por ser una

condición más real para la germinación de la semilla. Los formulados utilizados contenían $1,4 \times 10^9$ y $3,3 \times 10^9$ esporas/gramos y viabilidad 70 y 77%.

La siembra se realizó en bandejas con capacidad para 96 semillas (celdas). Se evaluaron 4 tratamientos y 4 repeticiones (4 bandejas) de cada uno de ellos, con una repetición (bandeja) de cada tratamiento distribuida aleatoriamente en cada bloque. Los 4 tratamientos fueron semillas tratadas con una solución de formulado rehidratado en agua a una concentración 3×10^8 esporas/mL (usada para evaluación de promoción de crecimiento), tratamiento con una suspensión de esporas frescas de *Trichoderma* a la misma concentración, semillas tratadas con una solución de quitosano al 0,1% (siguiendo indicaciones de uso de Biorend®), y un tratamiento control con agua. La inoculación se realizó en frascos con agua, utilizando 0,4 mL de suspensión inoculante por gramo de semilla (50 semillas).

A partir de los 5 días se evaluó la cantidad de plantas por bandeja, el recuento se llevó a cabo hasta el día que no cambió el valor de emergencia. En la Figura 4 se presenta una imagen de uno de los ensayos realizados.

Se analizaron los valores de germinación obtenidos durante los primeros días para determinar un posible efecto *priming*, y los valores de germinación final. Se utilizó el software R versión 4.1.0 (R Core Development Team, 2021). Los datos de emergencia se analizaron mediante un modelo lineal generalizado asumiendo distribución Poisson, con ajuste quasi-Poisson de ser necesario, y posteriormente para la comparación de medias se aplicó el Test LSD ($p > 0,05$).



Figura 4. *Siembra de semillas en bandejas con suelo obtenido de plantaciones de arroz.* Ensayo realizado en invernáculo para evaluación del efecto del formulado sobre la germinación de semillas de arroz.

4.4.1.3. Efecto del formulado en la emergencia de arroz en el campo

El efecto del formulado sobre la germinación de semillas de arroz fue también evaluado a nivel de campo. Los ensayos se realizaron en la estación de INIA Treinta y Tres junto al Dr. Sebastián Martínez.

Se inoculó en bolsas con 1 kg de semillas, adicionando 71 mL de suspensión inoculante por Kg de semilla. Los 4 tratamientos aplicados fueron: formulado rehidratado a dosis alta (5×10^7 e/mL) para lograr una impregnación teórica de 8×10^4 esporas/semilla, formulado rehidratado a dosis baja (5×10^6 e/mL) con impregnación teórica de 8×10^3 esporas/semilla, curasemilla comercial y un control con agua. El formulado utilizado contenía $2,8 \times 10^9$ esporas/g y viabilidad 67%. El curasemilla comercial utilizado fue Riceseed 76fs, con los principios activos tiametoxan 70g/L y tebuconazole 6 g/L y la dosis usada fue la recomendada en la etiqueta 500cc cada 100 Kg de semillas.

Luego de la inoculación se sembraron en campo 4 parcelas por tratamiento. El ensayo se llevó a cabo en 2 variedades distintas de arroz: Cultivar 9193 y Cultivar MERIN. La emergencia se evaluó 20, 25 y 30 días post siembra. En la Figura 5 se muestran imágenes del momento de la inoculación de semillas y siembra en campo.

Para el análisis de datos de emergencia se utilizó un modelo lineal generalizado asumiendo distribución quasi-Poisson y posteriormente se aplicó el Test LSD ($p>0,05$) para comparación de medias, utilizando el software R versión 4.1.0 (R Core Development Team, 2021).



Figura 5. Inoculación de semillas y posterior siembra en campo

4.4.2. Efecto del formulado en la promoción del crecimiento vegetal

La promoción de crecimiento vegetal se evaluó en invernáculo mediante ensayos de inoculación de las semillas y posterior evaluación del peso seco de la planta. Se evaluaron 3 tratamientos: formulado rehidratado, suspensión de esporas frescas de *Trichoderma* y agua como tratamiento control. Las semillas utilizadas fueron de los mismos cultivares que ensayos iniciales: arroz cultivar INIA Tacuarí y trigo Génesis 4.33.

Se inocularon 4 semillas por maceta y un total de 10 macetas por tratamiento. El sustrato utilizado fue una mezcla de arena, vermiculita y turba. Luego de 15 días se registró el número de semillas germinadas y se conservaron sólo 2 plántulas por maceta, las que mostraron comportamiento más homogéneo en su crecimiento.

Transcurridos 60 o 40 días, arroz y trigo respectivamente, se cosechó la parte aérea y se secó en estufa a 65°C hasta peso constante. Finalmente se pesó la biomasa aérea.

4.4.2.1. Arroz

El tratamiento de interés consistió en inocular semillas con formulado rehidratado. Los gramos de producto en polvo a rehidratar se calcularon considerando la concentración de esporas/g del formulado, el volumen final a ser usado (0,4 mL) y la concentración final deseada de la solución inoculante (3×10^8 esporas/mL). Se inocularon 50 semillas con 0,4 mL de suspensión.

El segundo tratamiento se basó en la inoculación de semillas con una suspensión de esporas frescas de *Trichoderma*, en igual concentración a la del tratamiento anterior (3×10^8 esporas/mL). El volumen por cantidad de semillas fue igual al tratamiento de semillas con formulado. Como tratamiento control se inocularon semillas en una solución de agua. Los bioensayos se repitieron 2 veces. Los formulados utilizados presentaban una concentración de $8,7 \times 10^8$ y $1,3 \times 10^9$ esporas/gramo y valores de germinación de 71 y 75% respectivamente.

Una vez inoculadas las semillas se tomó una muestra de 5 semillas que fueron sumergidas en eppendorf con 1 mL de solución salina (0,85%) con tween (0,02%), además, se tomaron muestras de semillas individuales. El eppendorf fue agitado en vortex, y finalmente se realizó el recuento de esporas/semilla. Para esto se realizaron diluciones y se sembró 100 μ L en PDA, por duplicado, se incubó a 25°C y a las 48 hs se realizó el recuento de colonias. Finalmente se determinó el valor estimado de esporas impregnadas/semilla.

Los mismos ensayos fueron realizados en la estación INIA Treinta y Tres siguiendo la misma metodología, cambiando el sustrato artificial por suelo de bosque. Los formulados utilizados contenían $1,4 \times 10^9$ y $3,3 \times 10^9$ esporas/gramo y viabilidad 70 y 77%.

4.4.2.2. Trigo

La promoción de crecimiento en trigo fue evaluada de igual manera que para arroz, pero se utilizó una solución de formulado de concentración 3×10^7 esporas/mL, y la misma concentración para el tratamiento con suspensión de esporas frescas de *Trichoderma*. La inoculación de semillas se realizó en frascos, utilizando 0,4 mL de suspensión inoculante por gramo de semilla (50 semillas). El ensayo completo se repitió un total de 3 veces de forma independiente. Los formulados utilizados en los

ensayos contenían $6,5 \times 10^8$ e/g y 72% viabilidad, $1,3 \times 10^9$ e/g, 70% viabilidad y $1,2 \times 10^9$ e/g y germinación 67%.

El análisis de los datos de peso seco de parte aérea fue realizado usando el software R versión 4.1.0 (R Core Development Team, 2021), se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), las variables fueron transformadas mediante la función log cuando fue necesario y posteriormente se realizó comparación de medias con LSD Test ($p > 0,05$).

4.4.3. Efecto del formulado en el control biológico

4.4.3.1. Efecto del formulado en el control de enfermedad en plantas de trigo

Para evaluar la efectividad del formulado como agente de control biológico *in vivo* se utilizaron semillas infectadas con *Fusarium* del cultivar susceptible frente a fusariosis de la espiga INIA Don Alberto, que fueron inoculadas con 4 tratamientos: *Trichoderma asperellum* ILB397 formulado, suspensión de esporas de *Trichoderma asperellum* ILB397, solución de quitosano y control inoculado con agua. Los ensayos se realizaron en el invernáculo en bandejas con un sustrato compuesto por arena, vermiculita y turba. Se inocularon un total de 20 semillas con cada tratamiento, luego se sembraron 5 semillas de cada tratamiento en cada uno de los 4 bloques (bandejas), cada semilla en una celda individual. En la Figura 6 se muestra una fotografía de uno de los ensayos realizados.

Los formulados usados para las 3 repeticiones del ensayo presentaban una concentración de $6,5 \times 10^8$ esporas/g con viabilidad del 72%, $1,3 \times 10^9$ esporas/g 70% viable y $1,2 \times 10^9$ esporas/g viabilidad 67%. Todos ellos obtenidos a través del *spray dryer* partiendo de suspensiones con quitosano al 1,5%, PEG 0,5%, maltodextrina 10% y *Trichoderma* (1×10^{10} esporas) cosechado de arroz con 0,015% de quitosano.

Se evaluó emergencia y 21 días post cosecha se evaluó la sanidad de las plantas emergidas. Se realizaron un total de tres ensayos independientes.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó usando el software R versión 4.1.0 (R Core Development Team, 2021). Considerando los conteos de emergencia se aplicó un modelo lineal generalizado, asumiendo distribución Poisson y posterior comparación de medias con el Test LSD

($p>0,05$). El mismo modelo y posterior aplicación del Test HSD Tukey, se usó para la comparación de tratamientos en cada categoría de sanidad de la planta.



Figura 6. Evaluación del efecto del formulado sobre semillas de trigo enfermas en invernáculo. Semillas de trigo previamente infectadas con *Fusarium* y luego tratadas con formulado (F), esporas de *Trichoderma* sin formulado (T), quitosano (Q) y control (C).

4.4.3.2. Efecto del formulado en el control de enfermedad en plantas de arroz

La evaluación del control de enfermedad en plantas de arroz se realizó en invernáculo, en la estación experimental INIA Treinta y Tres, con la colaboración del Dr. Sebastián Martínez y personal de apoyo. Se evaluaron 4 tratamientos: semillas tratadas con una solución de formulado rehidratado de concentración 3×10^8 esporas/mL, tratamiento con una suspensión de esporas de *Trichoderma* a la misma concentración, semillas tratadas con quitosano (Biorend®) y un tratamiento control con agua. Los formulados utilizados para el control biológico en plantas de arroz contenían $1,4 \times 10^9$ y $3,3 \times 10^9$ esporas/gramos y con una viabilidad de 70 y 77% respectivamente.

Se utilizaron macetas con suelo extraído de mantillo de bosque, en cada maceta se sembraron 8 semillas de arroz previamente inoculadas con el tratamiento correspondiente. Se realizaron 10 macetas por tratamiento, ubicando una maceta de cada tratamiento por bloque. Luego de la

emergencia se dejaron solamente 4 plantas por maceta para posterior inoculación. El mismo diseño fue realizado para ambos patógenos *Nakataea oryzae* y *Rhizoctonia oryzae sativa*.

En la Figura 7 se presenta una imagen del ensayo 25 días post siembra.

A los 70 días luego de la siembra y con las plantas a tamaño moderado, se les inoculó el patógeno. Las cepas utilizadas para infección fueron *Nakatea oryzae* cepa ILB425 y *Rhizoctonia oryzae sativa* ILB427.

Se aplicó el método de inoculación descrito en Rosas *et al.* (2016), en la base del tallo de cada una de las plantas se pegó un disco de 5 mm de diámetro de agar con micelio fresco. Para ello, los aislados crecieron durante 7 días a 25°C en placas de Petri de 90 mm con PDA. Del borde de las placas con crecimiento activo de los patógenos se tomaron los discos y se adhirieron en la base del tallo con *Parafilm* (Figura 8).

Se realizaron 2 ensayos independientes para cada patógeno.



Figura 7. Plantas de arroz con 25 días de crecimiento en uno de los ensayos de efectividad del control biológico de enfermedades

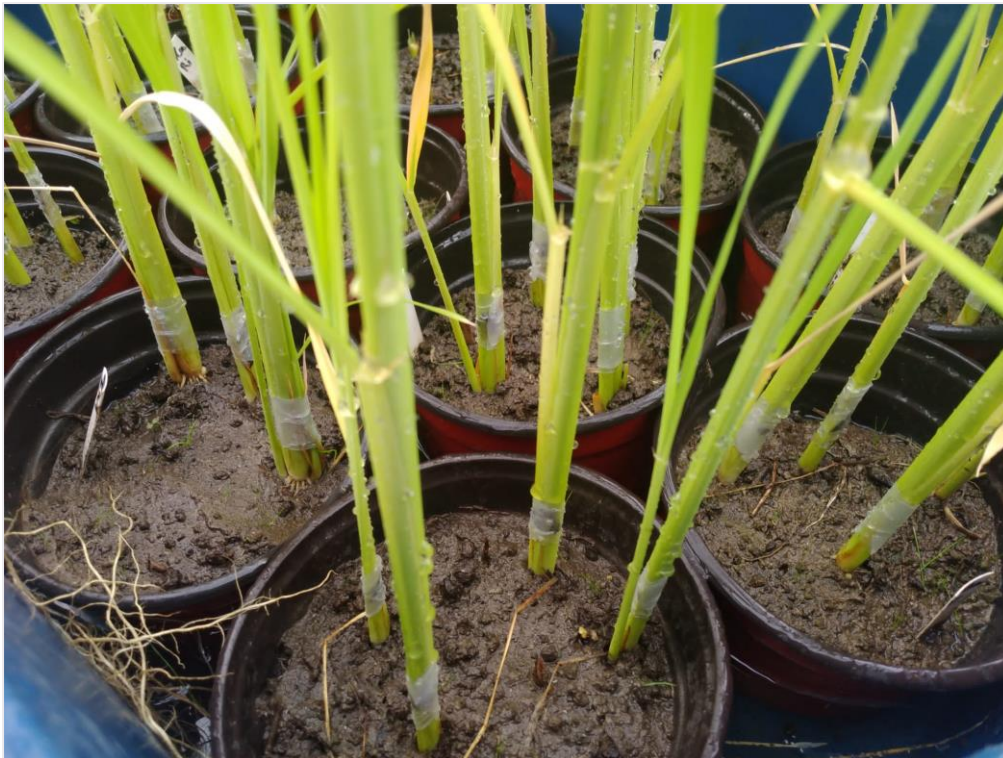


Figura 8. Plantas de arroz infectadas con patógeno. Inoculación sobre el tallo de las plantas utilizando la técnica de inoculación descrita por Rosas *et al.* (2016).

La severidad de la podredumbre del tallo y mancha agregada de la vaina fueron evaluadas en dos momentos: 3 semanas post inoculación y una evaluación final (2 semanas luego de la primera evaluación) con plantas en estado avanzado de la enfermedad, usando una escala de lesión modificada del IRRI Sistema Estándar de Evaluación de Arroz (IRRI, 2002) descrito en Martínez (2016).

La podredumbre de tallo (*N. oryzae*) fue evaluada en una escala de 0-9 (Figura 9): 0= ausencia de síntomas; 1= lesión en el exterior de la vaina, en la zona de inoculación; 3= la infección atravesó la vaina; 5= la lesión alcanzó el tallo (cuando la infección se desplazó más allá de la zona de inoculación generando vainas secas, sin pasar al tallo se asignó un valor de 4); 7=tallo marchito con infección completa (cuando la lesión alcanzó el tallo y se dispersó sin afectarlo en su totalidad se adjudicó un valores de 6); 9= tallos necróticos.



Figura 9. Escala para evaluación de la podredumbre de tallo causada por el patógeno *Nakataea oryzae* ILB425

La escala usada en la evaluación de la mancha agregada de vaina (*R. oryzae sativa*) fue: 0=sin síntomas; 1=lesión en la zona de inóculo; 3=lesión en el 25% de la planta, cuando los síntomas se desplazan de la zona de inoculación sin completar el 25% de la planta lesionada se adjudicó un valor de 2; 5=lesión presente en el 50 %, cuando se observó lesión > a 25 y < 50 se indicó un grado de severidad de 4; 7=lesión en 75%; 9= infección grave o necrótica (Figura 10).

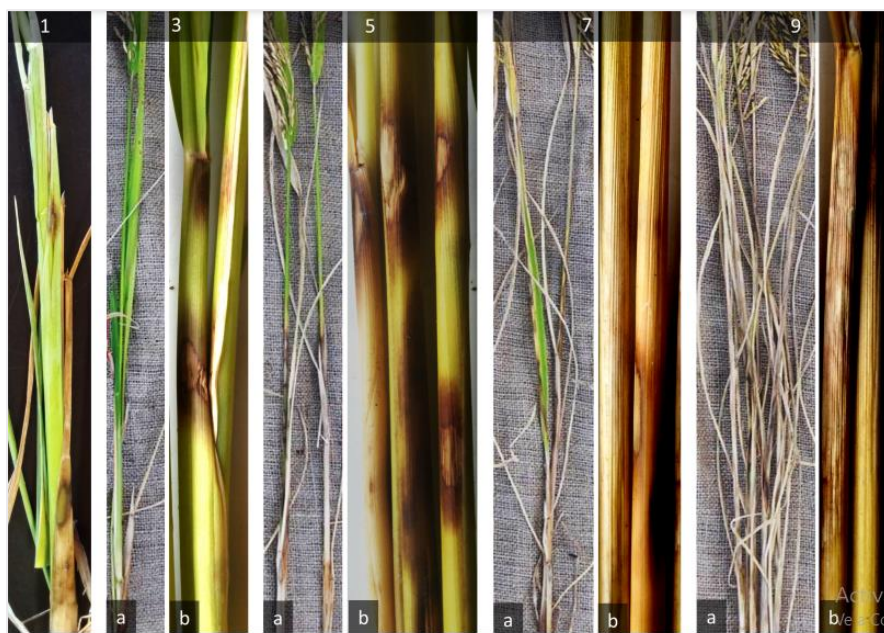


Figura 10. Escala para evaluación de la mancha agregada de vaina causada por el patógeno *Rhizoctonia oryzae sativa* ILB427

El análisis de datos se realizó en software R versión 4.1.0 (R Core Development Team, 2021), utilizando “cumulative link model” (clm) por tratarse de una variable ordinal. Para la comparación entre tratamientos se aplicó Test de Tukey ($p > 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización de aislados de *Trichoderma*

5.1.1. Promoción del crecimiento vegetal

La inoculación de semillas de arroz y trigo con esporas frescas de cepas de *Trichoderma*, en sustrato artificial en invernáculo, produjo diferencias significativas en el peso seco aéreo de las plantas resultantes (Tabla 1). En arroz, los tratamientos con las cepas ILB397 e ILB421 aumentaron un 30% el peso seco, seguidos de la cepa ILB423 que produjo un aumento del 23% sobre el control no tratado ($p < 0,05$).

En el peso seco aéreo de las plantas de trigo, la cepa TME produjo un 15% de aumento en el peso seco con respecto al control ($p < 0,05$), seguida de la cepa ILB397 y T1C con un 10% de aumento ($p < 0,1$).

En ambos cultivos, la cepa ILB397 tuvo un efecto positivo sobre el peso seco de la parte aérea, diferenciándose del control.

Tabla 1

Peso seco de parte aérea de plantas de arroz inoculadas con cepas de Trichoderma

Tratamiento	Peso seco ^{1,2}
Control no tratado	0,90 ± 0,10 ^c
ILB409	0,93 ± 0,08 ^{b c}
ILB424	0,96 ± 0,11 ^{a b c}
ILB394	0,97 ± 0,09 ^{a b c}
ILB404	1,00 ± 0,10 ^{a b c}
ILB416	1,08 ± 0,05 ^{a b c}
ILB396	1,08 ± 0,10 ^{a b c}
ILB395	1,09 ± 0,09 ^{a b c}
ILB412	1,11 ± 0,07 ^{a b c}
ILB423	1,11 ± 0,07 ^{a b}
ILB397	1,17 ± 0,09 ^{a b}
ILB421	1,17 ± 0,08 ^a

Nota 1. Los valores mostrados son la media de 18 repeticiones obtenidas a partir de 2 ensayos independientes en el tiempo, ± error estándar.

Nota 2. Medias con misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla 2

Peso seco de parte aérea de plantas de trigo inoculadas con cepas de Trichoderma

Tratamiento	Peso seco ^{1,2}
BL	0,99 ± 0,06 ^b
ILB424	1,04 ± 0,05 ^b
ILB423	1,05 ± 0,07 ^{a b}
ILB421	1,07 ± 0,05 ^{a b}
T1C	1,09 ± 0,06 ^{a b}
ILB397	1,09 ± 0,05 ^{a b}
TME	1,15 ± 0,07 ^a

Nota 1. Los valores mostrados son la media de 30 repeticiones obtenidas a partir de 3 ensayos independientes en el tiempo, ± error estándar.

Nota 2. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

5.1.2. Control Biológico *in vitro*

5.1.2.1. Efecto antagonista de las cepas de *Trichoderma* sobre cepas de *Fusarium*

El efecto antagonista de las cepas de *Trichoderma* sobre cepas de *F. graminearum* evaluado mediante ensayos de cultivos duales, se analizó de forma cuantitativa (% de inhibición de crecimiento) utilizando las mismas cepas que en ensayos de promoción de crecimiento. Se sumó cepa ILB395 por presentar buenos resultados en trabajo paralelo de Paula Sanguñedo.

De la evaluación cuantitativa (Figura 11) se confirmó que las cepas aisladas de trigo (TME y T1C), previamente seleccionadas por su capacidad de control de *F. graminearum* (Cabrera, 2009), presentaron alta capacidad de inhibición de crecimiento sobre ambas cepas del patógeno (TME: 78 y 77%, T1C: 73 y 74%). Estadísticamente todas las cepas disminuyeron el crecimiento de ambas cepas de *F. graminearum*, destacando la cepa TME con una capacidad de control sobre *F. graminearum* F09005 significativamente mayor al resto de las cepas ($p < 0,1$).

Como se puede ver en las Figuras 12 y 13 las cepas TME y T1C controlaron completamente los patógenos de trigo creciendo por encima de ellos.

A su vez, las cepas ILB397 e ILB423 también mostraron crecimiento y esporulación sobre ambas cepas de *F. graminearum*.

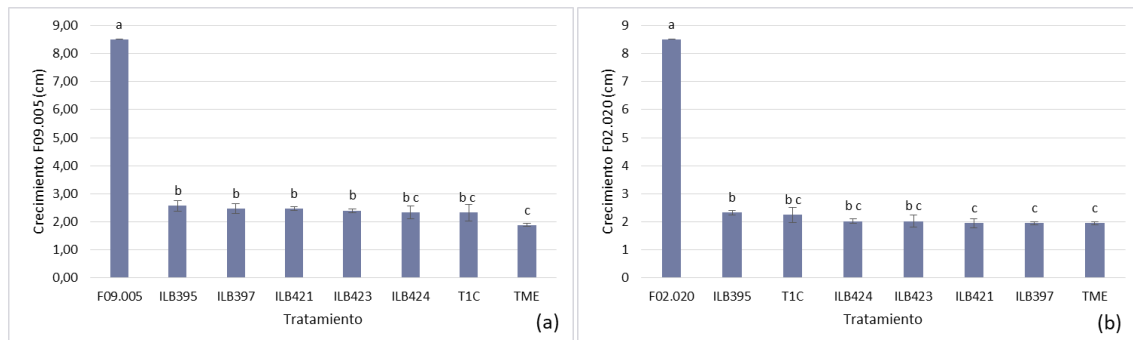


Figura 11. Crecimiento de colonias de *Fusarium graminearum*. Gráfico (a) corresponde a la cepa F09005 y el (b) a la cepa F02020, a los 10 días de incubación. Los valores son el promedio de 2 réplicas y 2 repeticiones $\pm$ error estándar. Letras iguales no indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

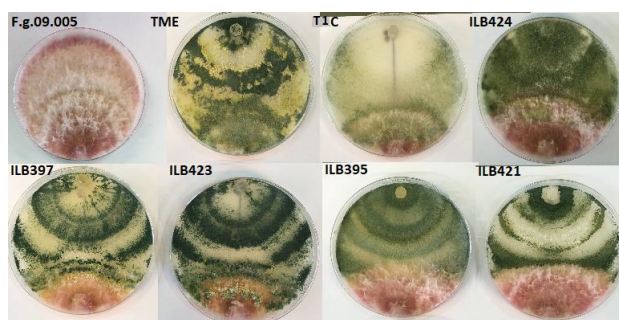


Figura 12. Cultivos duales con 10 días de incubación. Cepas de *Trichoderma* en oposición al patógeno *Fusarium* F09005.

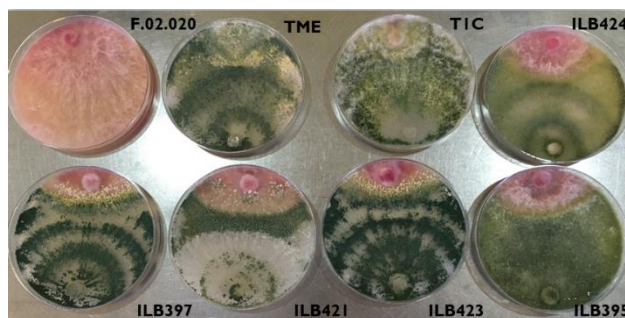


Figura 13. Cultivos duales con 10 días de incubación. Cepas de *Trichoderma* en oposición al patógeno *Fusarium* F02020.

5.1.2.2. Control cepas patógenas de arroz: *Nakataea oryzae* ILB425 y *Rhizoctonia oryzae sativa* ILB427

Se realizaron los cultivos duales y medición de % de inhibición del crecimiento de los patógenos *Nakataea oryzae* ILB425 y *Rhizoctonia oryzae sativa* ILB427 en oposición a las cepas ILB397, ILB412, ILB423, K, ILB424, ILB421, ILB395, TME y T1C, seleccionadas por buenos resultados en ensayo de promoción de crecimiento y cepas comerciales. Se sumaron las evaluadas en los ensayos de actividad antagonista vs *Fusarium* para así obtener un mapa completo del comportamiento de las mismas cepas como controladoras de los patógenos del arroz y del trigo.

Todas las cepas generaron una reducción significativa ($p < 0,05$) en el crecimiento de los patógenos (Figura 14). La cepa TME presentó cuantitativamente el valor más alto de inhibición en ambos ensayos (75 y 78%), generando el menor radio de crecimiento de los patógenos. Seguida en ambos por la cepa ILB397 (73 y 75%). Excepto la cepa ILB424, todas las cepas de *Trichoderma* crecieron por encima del *Nakataera oryzae* ILB425 (Figura 15). Las cepas ILB424 y la T1C no presentaron capacidad de crecer por encima del patógeno *R. oryzae sativa* ILB427 (Figura 16). Considerando los ensayos cuantitativos y observaciones cualitativas de sobre crecimiento, se pudo observar que las cepas TME, ILB397 e ILB423 mostraron el mayor control de los hongos patógenos de ambos cultivos.

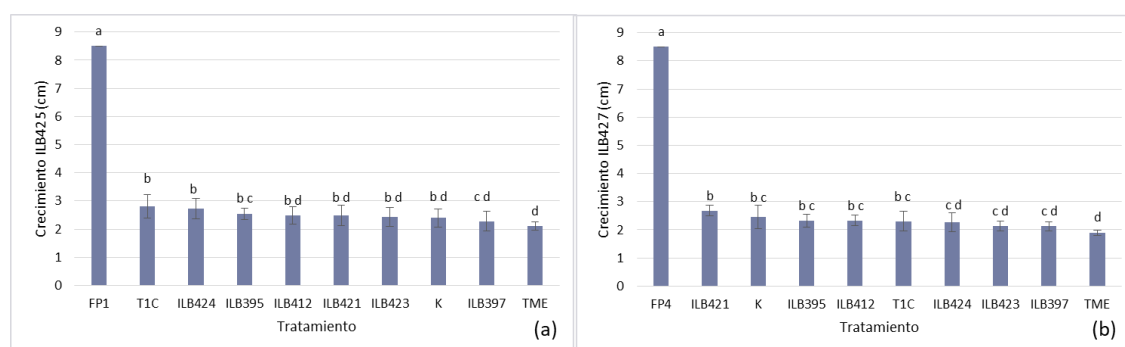


Figura 14. Crecimiento de colonias de patógenos de arroz. Crecimiento en cm de *Nakataea oryzae* (a) y *Rhizoctonia oryzae sativa* (b) luego de 10 días de incubación. Valores son el promedio de 2 réplicas y 2 repeticiones $\pm$ error estándar.

Letras iguales no indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

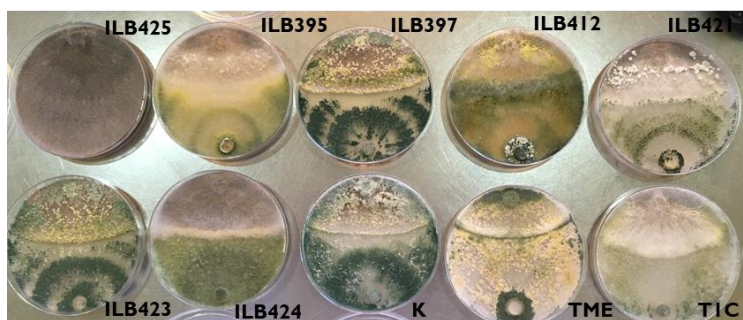


Figura 15. Cultivos duales luego de 10 días de incubación. Patógeno *Nakataea oryzae* ILB425 en oposición a cepas de *Trichoderma*.

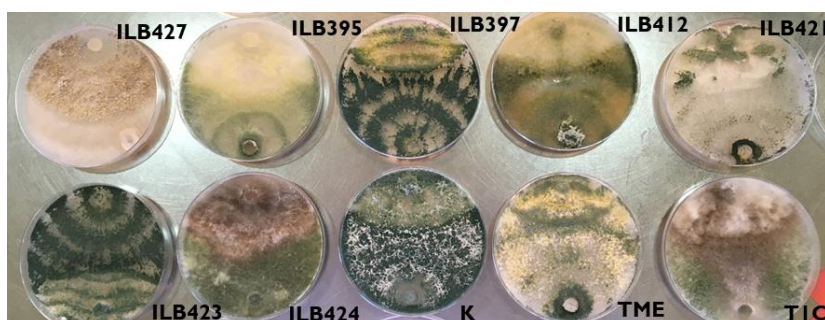


Figura 16. Cultivos duales luego de 10 días de incubación. Patógeno *Rhizoctonia oryzae sativa* ILB427 en oposición a cepas de *Trichoderma*.

5.1.3. Compatibilidad *Trichoderma* – agente encapsulante

Para evaluar la compatibilidad entre *Trichoderma* y quitosano (agente encapsulante) se evaluó la germinación, crecimiento y posible sinergia para el control de los patógenos, mediante la suplementación del medio de cultivo con quitosano.

5.1.3.1. Germinación

El suplemento de quitosano al medio agar agua (AA) a baja concentración (0,03%) mejoró la germinación de algunas de las cepas (Figura 17), siendo significativo este aumento en la cepa ILB397 a las 16 horas de incubación. En medio PDA, el efecto positivo de la suplementación de quitosano al 0,03% no fue observado, ya que la germinación fue cercana al 100% tanto en medio puro como en PDA suplementado con 0,03% quitosano (Figura 18).

La suplementación de quitosano a dosis más altas (0,07 y 0,1%) afectaron de forma negativa la germinación de las cepas de *Trichoderma* en PDA y AA ($p < 0,05$). En AA no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos para cada nivel de suplementación de quitosano, sin embargo, a pesar del efecto negativo de la suplementación al 0,07% la cepa ILB423 presentó germinación mayor

al resto, seguida por la cepa ILB397. Es importante destacar que una vez transcurridas las 30 hs de incubación las cepas ILB397 e ILB423 fueron las únicas capaces de crecer en el medio de mayor suplementación (0,1%).

Comparando el comportamiento de las distintas cepas en cada nivel de suplementación de quitosano al medio PDA, Figura 18, se observó que las cepas ILB397 y ILB423 lograron los mayores porcentajes de germinación en los medios con alta suplementación. Cuando se suplementó 0,07% de quitosano la cepa ILB423 presentó germinación significativamente mayor que el resto ($p < 0,05$), excepto en comparación a la cepa ILB397, la cual fue la segunda con mejor germinación diferenciándose de las cepas ILB424, TME y T1C. Al 0,1 % -el nivel más alto de suplementación con quitosano- la mayor germinación fue alcanzada por las cepas ILB423 e ILB397 ($p < 0,05$).

Por otro lado, la cepa T1C presentó la menor capacidad de germinación a altas concentraciones tanto en AA como en PDA.

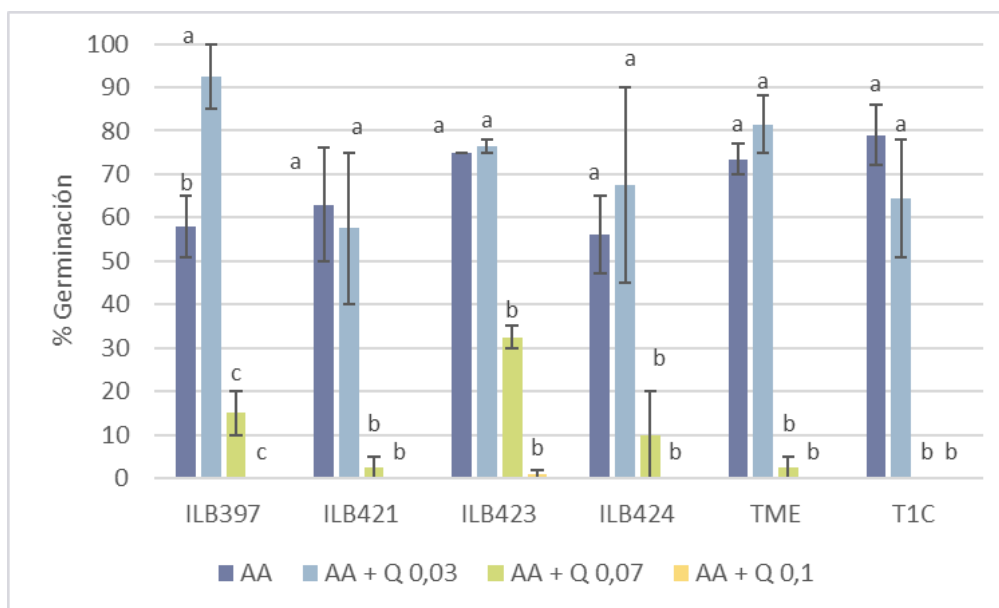


Figura 17. Germinación de cepas de *Trichoderma* en medio agar agua suplementado con quitosano. Valores son el promedio de germinación de 2 ensayos independientes $\pm$ error estándar. Letras iguales no indican diferencias significativas ($p>0,05$) en la germinación de cada cepa a las distintas concentraciones de quitosano.

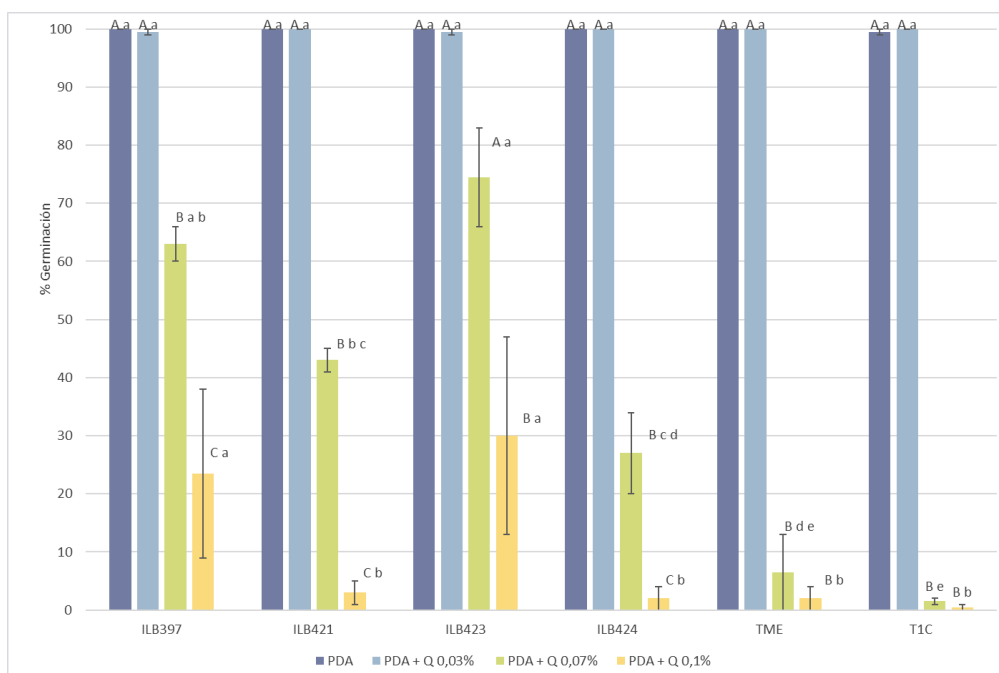


Figura 18. Germinación de cepas de *Trichoderma* en medio PDA suplementado con quitosano. Valores son el promedio de germinación de 2 ensayos independientes $\pm$ error estándar. Letras mayúsculas iguales no indican diferencias significativas ($p>0,05$) en la germinación de cada cepa a las distintas concentraciones de quitosano. Letras minúsculas iguales no indican diferencias significativas ($p>0,05$) entre cepas para cada condición de cultivo (igual nivel de suplementación de quitosano).

5.1.3.2. Crecimiento

El crecimiento de las cepas T1C, ILB397 e ILB423 en PDA no se vio afectado por la suplementación de quitosano al 0,03%, y presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de las cepas. A mayores niveles de quitosano, la cepa T1C logró mayor crecimiento que las otras cepas y sólo se vio levemente afectada al 0,10 % (Tabla 3).

Para el resto de las cepas evaluadas, ILB421, ILB424 y TME, todas las concentraciones de quitosano afectaron significativamente su crecimiento, siendo el crecimiento menor a mayor porcentaje de quitosano suplementado al medio de cultivo ($p < 0,05$).

El efecto observado de la suplementación con quitosano sobre el crecimiento de las cepas fue diferente según el medio suplementado fuese PDA o AA. Por ejemplo, T1C fue levemente afectada por 0,10% de quitosano en PDA, pero el efecto fue mucho mayor en AA (Figura 19).

Considerando el efecto de la suplementación de quitosano sobre la germinación de las esporas y el crecimiento, se observó que la cepa T1C tuvo un comportamiento muy variable ya que fue muy afectada en su germinación, pero no en su crecimiento a partir de un *plug* de agar. Por otra parte, las cepas ILB397 y 423 destacaron en ambos ensayos siendo las que mostraron menor efecto del quitosano sobre la germinación y una tolerancia intermedia en su crecimiento.

Los resultados se muestran en la Figura 19 expresados como porcentaje de crecimiento de cada cepa en el medio suplementado, calculado como $\text{crecimiento en medio con quitosano} \div \text{crec. placa control} \times 100$, y en la Tabla 3 en unidades de crecimiento (cm) de las cepas de *Trichoderma* con los resultados del análisis estadístico.

Tabla 3

Crecimiento radial de las cepas de Trichoderma spp. con suplementación creciente de quitosano en el medio de cultivo

Cepa	MEDIO DE CULTIVO + CONCENTRACION QUITOSANO			
	PDA	PDA + Q 0,03%	PDA + Q 0,07%	PDA + Q 0,1%
ILB397	^a 8,50 ± 0,00 ^a	^a 8,23 ± 0,12 ^a	^b 7,04 ± 0,23 ^b	^c 5,30 ± 0,14 ^c
ILB421	^a 8,50 ± 0,00 ^a	^b 6,97 ± 0,15 ^b	^c 4,09 ± 0,08 ^c	^d 2,34 ± 0,16 ^e
ILB423	^a 8,50 ± 0,00 ^a	^a 8,29 ± 0,11 ^a	^b 7,65 ± 0,22 ^b	^c 5,93 ± 0,11 ^b
ILB424	^a 8,43 ± 0,06 ^a	^b 6,42 ± 0,05 ^c	^c 2,94 ± 0,12 ^d	^d 1,81 ± 0,08 ^f
TME	^a 8,43 ± 0,07 ^a	^b 7,24 ± 0,09 ^b	^c 4,58 ± 0,11 ^c	^d 4,04 ± 0,12 ^d
T1C	^a 8,49 ± 0,01 ^a	^a 8,50 ± 0,00 ^a	^a 8,50 ± 0,00 ^a	^b 7,84 ± 0,06 ^a

Nota 1. Los valores indican el crecimiento (cm) luego de 72 hs de incubación. Cada uno representa el promedio de 6 réplicas ± error estándar.

Nota 2. Diferentes letras en el superíndice derecho indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cepas para cada concentración de quitosano (Q). Letras en el superíndice izquierdo muestran las diferencias de crecimiento para cada cepa en distinto medio.

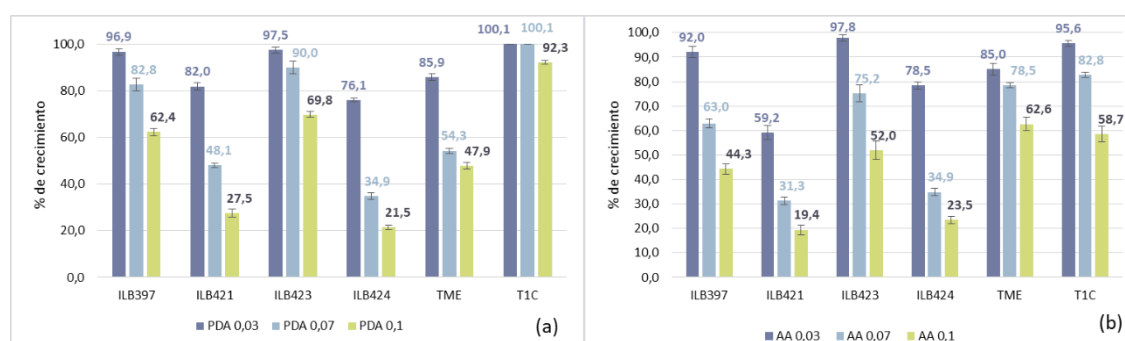


Figura 19. Efecto del quitosano sobre el crecimiento de *Trichoderma*. Crecimiento de cepas en medio PDA (a) y AA (b). Se expresa el % de crecimiento relativo al control luego de 72 hs de incubación. Cada valor representa la media de 6 repeticiones de 2 ensayos independientes ± error estándar.

5.1.3.3. Efecto del cambio en el pH debido a la suplementación de quitosano

La adición de Biorend® al medio PDA, equivalente a un rango de concentración de quitosano, produjo un descenso del pH del medio de hasta 0,58 (Tabla 4). En las placas de PDA acidificadas con ácido

láctico en el mismo rango de pH que las suplementadas con Biorend®, no se observaron cambios en la germinación, que fue 100%.

Tabla 4

pH registrado con concentraciones creciente de quitosano en el medio de cultivo

	PDA	PDA + Q 0,03%	PDA + Q 0,07%	PDA + Q 0,1%
pH	5,28	4,92	4,72	4,70

5.1.3.4. Uso combinado de *Trichoderma* y quitosano *in vitro*

Se evaluó el crecimiento de los patógenos *Fusarium* F09005, F02020, *Nakataea oryzae* ILB425 y *Rhizoctonia oryzae sativa* ILB427 en medio PDA suplementado con quitosano, en oposición al *Trichoderma* ILB397 y aplicando la combinación de ambos agentes.

La suplementación de 0,07% de quitosano al medio PDA redujo el crecimiento de todos los patógenos (Figura 20). Sin embargo, el efecto del quitosano fue estadísticamente significativo sobre las cepas de *F. graminearum* y *N. oryzae*, pero no sobre *R. oryzae sativa*.

Por otra parte, la inhibición de los patógenos causada por *Trichoderma* fue mayor que la obtenida por el quitosano. Además, estadísticamente todos los aislados de *Trichoderma* lograron mayor o igual inhibición de los patógenos al aplicarlos en conjunto con quitosano, excepto las cepas de *Trichoderma* ILB421 e ILB424. En estos dos tratamientos la inhibición del patógeno fue mayor o igual al usar únicamente *Trichoderma*, lo cual refleja una posible interacción negativa entre el quitosano y dichas cepas. El uso combinado de las cepas ILB397, ILB423 y T1C con quitosano fue estadísticamente más efectivo en el control de las cepas de *F. graminearum* respecto a los efectos individuales. En el control del patógeno *R. oryzae sativa* destacaron las cepas ILB397 e ILB423 ambas en combinación con quitosano, mostrando resultados de inhibición significativamente mejores al resto de los tratamientos, mientras que frente al patógeno *N. oryzae* solo la cepa ILB397 mostró un aumento significativo al aplicarse en conjunto con el quitosano. La aplicación de quitosano junto a las cepas

ILB397 e ILB423 fueron los tratamientos que generan el menor crecimiento de todos los patógenos evaluados, sin embargo, este control no se evidenció estadísticamente en todos los casos.

A pesar de los resultados anteriormente expresados, analíticamente no todas las combinaciones presentan sinergia de efectos, $SF = (\text{control observado} / \text{esperado}) > 1$ (Tabla 5). La cepa ILB397 presentó valores que indican sinergia con el quitosano para el control de los patógenos F09005, ILB425 e ILB427, pero no en oposición a F02020 donde el SF no permite determinar sinergia, pero sí un comportamiento muy cercano a la aditividad de efectos.

La cepa ILB423 mostró sinergia de efecto con el quitosano cuando se opuso a las cepas F09005 e ILB427. Cuando el patógeno fue ILB425 o F02020, los resultados obtenidos indicaron que la interacción presente es de aditividad o levemente antagonista ($SF < 1$), cercana a aditividad.

Los aislados TME y T1C presentaron valores de SF que indican una interacción levemente antagonista con quitosano ($SF\text{-TME} = 0,95$) o cercana a la aditividad ($SF\text{-T1C} = 0,99$) cuando son enfrentados al F09005. En oposición a F02020, ambas cepas fueron antagónicas con el quitosano.

Estos resultados fortalecen lo observado previamente, donde las cepas ILB397, ILB423 y T1C fueron las más tolerantes al quitosano.

Además, podemos afirmar que la cepa ILB424, previamente confirmada como la más sensible al quitosano fue la que presentó la menor capacidad de control, y resultó antagónica con el quitosano. Incluso, los patógenos *F. graminearum* F09005, *N. oryzae* ILB425 y *R. oryzae sativa* ILB427 lograron crecer por encima de este *Trichoderma* en el medio suplementado con quitosano, en PDA puro F09005 e ILB425 también lograron crecer por encima de ILB424.

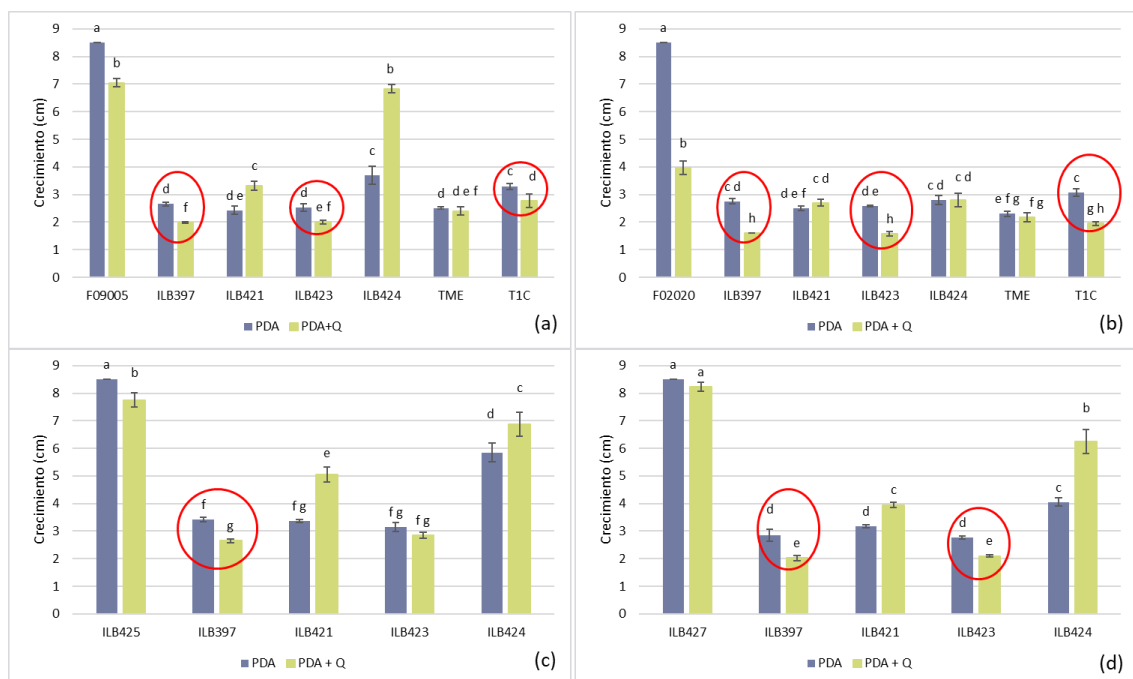


Figura 20. Crecimiento de patógenos en oposición a cepas de *Trichoderma*. Crecimiento de cepas en medio PDA sin suplementar (azul) o suplementado (verde) con quitosano al 0.07%. (a) crecimiento de *Fusarium graminearum* F09005, (b) *Fusarium graminearum* F02020, (c) *Nakataea oryzae* ILB425, (d) *Rhizoctonia oryzae sativa* ILB427. El valor de crecimiento se obtiene del promedio de 2 ensayos independientes con 2 réplicas, $\pm$ el error estándar.

En el APÉNDICE A se pueden ver las tablas con los resultados y valores considerados para obtener el factor de sinergia ($SF = \text{Cobs} / \text{Cesp}$) que se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5

Factor de sinergia del uso combinado de quitosano y cepas de Trichoderma para el control de Fusarium graminearum (cepas F09005 y F02020), Nakataea oryzae ILB425 y Rhizoctonia oryzae sativa ILB427

CEPA	Factor de sinergia ($SF = \%Cobs / \%Cesp$)			
	F09005	F02020	ILB425	ILB427
ILB397	1,04	0,96	1,09	1,13
ILB421	0,80	0,79	0,64	0,84
ILB423	1,01	0,95	1,00	1,10
ILB424	0,31	0,79	0,51	0,49
TME	0,95	0,85	-	-
T1C	0,99	0,93	-	-

5.1.4. Multiplicación en medio sólido

La cepa ILB421 presentó los mayores valores de producción de esporas en ambos ensayos realizados utilizando arroz como sustrato, siendo la cepa T1C la de menor producción. Considerando ambos ensayos, las 3 cepas con mayor rendimiento de esporas fueron la ILB421, ILB423 e ILB397 (Tabla 6).

Tabla 6

Concentración en número de esporas producidas por gramos de arroz seco y porcentaje de germinación

Cepa	Ensayo 1	Ensayo 2
	Concentración - Germinación	Concentración - Germinación
ILB397	$5,26 \times 10^9$ – 91%	$6,60 \times 10^9$ – 89%
ILB421	$1,72 \times 10^{10}$ – 94%	$2,74 \times 10^{10}$ – 88%
ILB423	$8,79 \times 10^9$ – 96%	$4,90 \times 10^9$ – 83%
ILB424	$9,44 \times 10^8$ – ¹	$6,60 \times 10^9$ – 97%
TME	$2,58 \times 10^9$ – 97%	$2,14 \times 10^9$ – 80%
T1C	$2,80 \times 10^8$ – ¹	$8,60 \times 10^8$ – <10%

Nota 1. * Se observó germinación, pero se dificultó el recuento debido a la presencia de restos de arroz.

5.1.5. Selección de cepa a encapsular

Los ensayos anteriormente descriptos permitieron describir las cepas con respecto a su actividad biológica *in vitro* (control biológico), *in planta* (promoción), y en relación con quitosano, que es el compuesto encapsulante propuesto para ser incluido en el secado de las esporas. La Tabla 7 resume la actividad o respuesta de cada cepa a través de las diferentes etapas de caracterización y permite seleccionar las mejores candidatas para ser incluidas en las etapas finales del proceso.

Se seleccionó la cepa ILB397 como candidata para la formulación debido que acumula mayor número de características positivas como actividad biocontroladora, promoción de crecimiento, sinergia con quitosano y productividad.

Tabla 7

Resumen de comportamiento de las cepas de Trichoderma frente a las pruebas realizadas para caracterizar su aptitud como bioinsumo

Cepa	Promoción crecimiento		Control biológico				Compatibilidad quitosano			Prod.* Sólido
	Arroz	Trigo	F09005	F02020	ILB425	ILB427	Germ.*	Crec.*	Sinergia	
ILB397	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ILB421	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓
ILB423	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ILB424	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓
TME	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓
T1C	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓

El símbolo ✓ indica capacidad para desarrollar la actividad, símbolo X ausencia de actividad. El nivel de desarrollo se visualiza mediante los colores, en escala ascendente: rojo (bajo), amarillo (medio) y verde (alto).

*Germ.: germinación de las cepas de *Trichoderma* en medio de cultivo suplementado con quitosano.

*Crec.: crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en medio de cultivo suplementado con quitosano.

*Prod.: producción de las cepas de *Trichoderma* en sustrato sólido (arroz)

5.1.6. Efecto del quitosano en la producción de *Trichoderma*

Como estrategia de adaptación de la cepa al contacto con quitosano previo al formulado, se evaluó el efecto del quitosano sobre la producción de *Trichoderma* en arroz. La evaluación se realizó únicamente sobre la cepa seleccionada para la formulación, ILB397.

Como se observa en la Tabla 8, la producción de esporas/gramo de arroz seco se vio significativamente beneficiada por la adición de 0,015% de quitosano al sustrato.

Tabla 8

Producción de esporas por Trichoderma asperellum ILB397 en arroz suplementado con quitosano a diferentes concentraciones

Tratamiento	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
H2O, control	1,05x10 ⁹	2,22x10 ⁹	1,02x10 ⁹	1,43x10 ⁹ ^b
0,015% Quitosano	3,37x10 ⁹	4,95x10 ⁹	2,83x10 ⁹	3,71x10 ⁹ ^a
0,03% Quitosano	1,25x10 ⁹	3,16x10 ⁹	2,42x10 ⁹	2,27x10 ⁹ ^b
0,06% Quitosano	1,07x10 ⁹	2,89x10 ⁹	2,33x10 ⁹	2,09x10 ⁹ ^b

Nota 1. Cada valor corresponde a un promedio de 2 repeticiones por ensayo. Valor promedio de 3 ensayos independientes con 2 repeticiones cada uno, n=6.

Nota 2. Diferentes letras indican diferencias significativas entre medias (p<0,05).

5.2. Producción de formulado

5.2.1. Producción y evaluación del formulado

Durante el proceso de formulación en *spray dryer* se probaron distintas condiciones de secado, variando la temperatura de ingreso y flujo de alimentación de la suspensión a deshidratar. La suspensión para el formulado presentaba una composición de 1,5% de quitosano, 0,5% de PEG, 10% de maltodextrina y una concentración de esporas en el orden de 10⁸ esporas/mL. Las esporas de *Trichoderma* fueron previamente producidas en bolsas de arroz, tal como se describe en la sección 4.2.4.

En la Tabla 9 se muestran las características de algunos formulados obtenidos trabajando a una temperatura de ingreso de 67-70°C y 12-15 % la velocidad de la bomba (alimentación de suspensión a deshidratar). En dichas condiciones de régimen de trabajo del *spray dryer* se pudieron obtener los mejores resultados, obteniendo un formulado con alta viabilidad de las esporas (%Germ. superior al

70% establecido como límite inferior), que fue aún mayor (%Sob. entre 81 y 97%) si se utiliza como base el porcentaje de viabilidad que las mismas exhibían antes del proceso de secado.

Tabla 9

Atributos de los distintos formulados de esporas de Trichoderma en spray dryer bajo diferentes condiciones de operación (corridas)

Corrida	%Germ	%Sob	Aw	Gramos	Concentración (E/g)	%E. recup	%E.v. recup	Condiciones
1	78	83	0,29	6,42	9,74x10 ⁸	59	49	Ti/To: 70/48,5 Bba:12%
2.1	78	89	0,31	6,35	9,45x10 ⁸	53	47	Ti/To: 70/49 Bba:12%
2.2	87	97	0,29	5,68	1,04x10 ⁹	55	54	Ti/To: 67/43,5 Bba:15%
3	68	82	0,3	5,32	6,20x10 ⁸	78	64	Ti/To: 70/47 Bba:12%
4	75	81	0,39	6,6	1,30x10 ⁹	80	65	Ti/To: 70/48 Bba:12%
5	79	84	0,28	6,35	3,20x10 ⁹	68	57	Ti/To: 70/41,5 Bba:12%

Nota. %Germinación: esporas viables en un recuento total de 100 esporas, promedio de 3 recuentos. %Sobrevivencia: (esporas viables / esporas viables preSD) * 100. El %E.recup: % de esporas recuperadas. %E.v.recup: % de esporas viables recuperadas.

La evaluación de los formulados en el tiempo mostró una importante caída en la germinación de las esporas almacenadas a 4°C (Figura 21). La capacidad de conservación fue variable, pero en todos los casos la viabilidad fue menor a 20% luego de 3 meses de almacenamiento. En la Tabla 10 se presenta la concentración de esporas viables/gramo de formulado para cada uno de los tiempos de evaluación.

A pesar de la caída en la viabilidad del producto, la concentración de esporas a los 3 meses de almacenamiento varió entre 1×10^7 y 6×10^8 esporas/g.

Cuando el formulado fue almacenado a temperatura ambiente las esporas fueron completamente dañadas, mostrando 0% de germinación, incluso cuando se utilizó absorbentes de oxígeno.

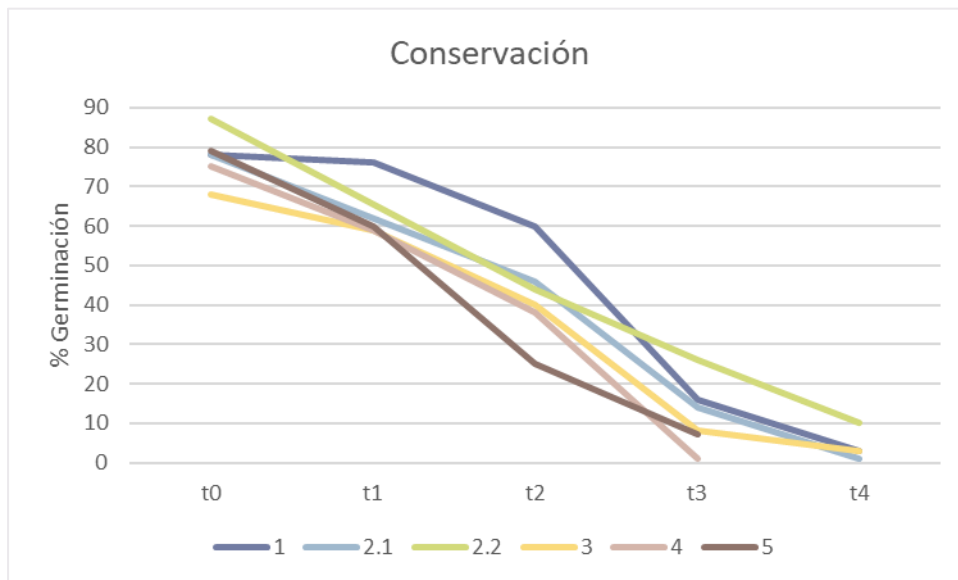


Figura 21. Viabilidad de los formulados en función del tiempo

t0: tiempo cero, germinación post *spray drying*.

t1: 3 semanas de almacenamiento a 4°C.

t2: 6 semanas de almacenamiento a 4°C.

t3: 10 semanas de almacenamiento a 4°C.

t4: 14 semanas de almacenamiento a 4°C.

Tabla 10

Concentración de esporas viables/gramo de formulado de distintas corridas a lo largo del tiempo, almacenados a 4°C

Producción	Tiempo de almacenamiento (semanas)				
	0	3	6	10	14
1	7,6x10 ⁸	7,4x10 ⁸	5,8x10 ⁸	1,6x10 ⁸	2,9x10 ⁷
2.1	7,4x10 ⁸	-	4,4x10 ⁸	1,3x10 ⁸	9,4x10 ⁶
2.2	9,1x10 ⁸	-	4,6x10 ⁸	2,7x10 ⁸	1,0x10 ⁸
3	4,2x10 ⁸	3,7x10 ⁸	2,5x10 ⁸	5,0x10 ⁷	1,9x10 ⁷
4	9,8x10 ⁸	7,7x10 ⁸	4,9x10 ⁸	1,3x10 ⁷	-
5	2,5x10 ⁹	1,9x10 ⁹	8,0x10 ⁸	2,24x10 ⁸	-

5.2.2. Microscopía electrónica de barrido

Las observaciones en microscopía electrónica de barrido de esporas de *Trichoderma* secas sin adición de material encapsulante, el formulado de trabajo, esporas deshidratadas con distintos materiales encapsulantes y los componentes del formulado deshidratados sin esporas se presentan en las Figuras 22 y 23.

El secado de una suspensión de esporas de *Trichoderma* sin agente encapsulante (22.a) mostró un aspecto apelmazado, sin forma, como efecto del daño sufrido por las esporas, impidiendo así su viabilidad y actividad. La matriz encapsulante sin esporas de *Trichoderma* (22.b) se observó de forma irregular, con partículas deformadas, tamaños variables, algunas colapsadas por el efecto del proceso. Al deshidratar la suspensión de esporas con el material encapsulante (22.c) las esporas se ven más definidas, con formación de estructuras a su alrededor.

Al disminuir la concentración de los componentes de la matriz (Figura 23) se pudo observar más claramente las

esporas de *Trichoderma*, rodeadas por una matriz irregular de formato indefinido, morfología

característica del secado mediante *spray dryer*.

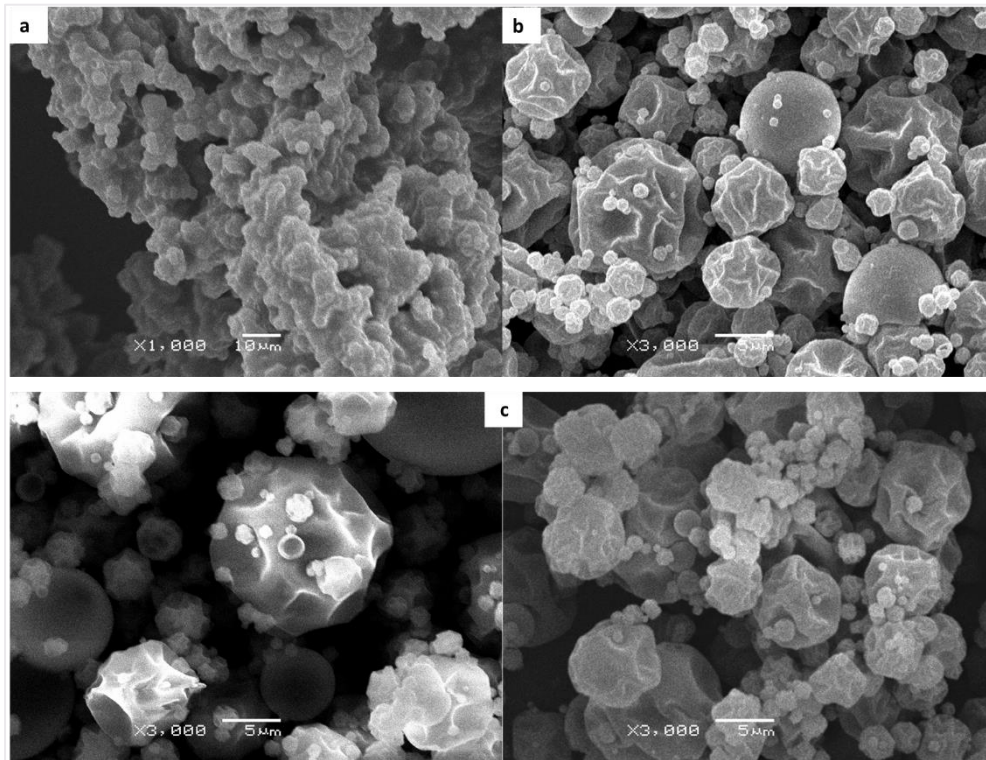


Figura 22. Microscopía SEM de productos secados en *spray dryer*. (a) esporas de *Trichoderma* deshidratadas sin formular, (b) componentes del formulado deshidratados sin el *Trichoderma* y (c) el formulado de esporas de *Trichoderma* con 1,5% de quitosano, 0,5% PEG y 10% maltodextrina.

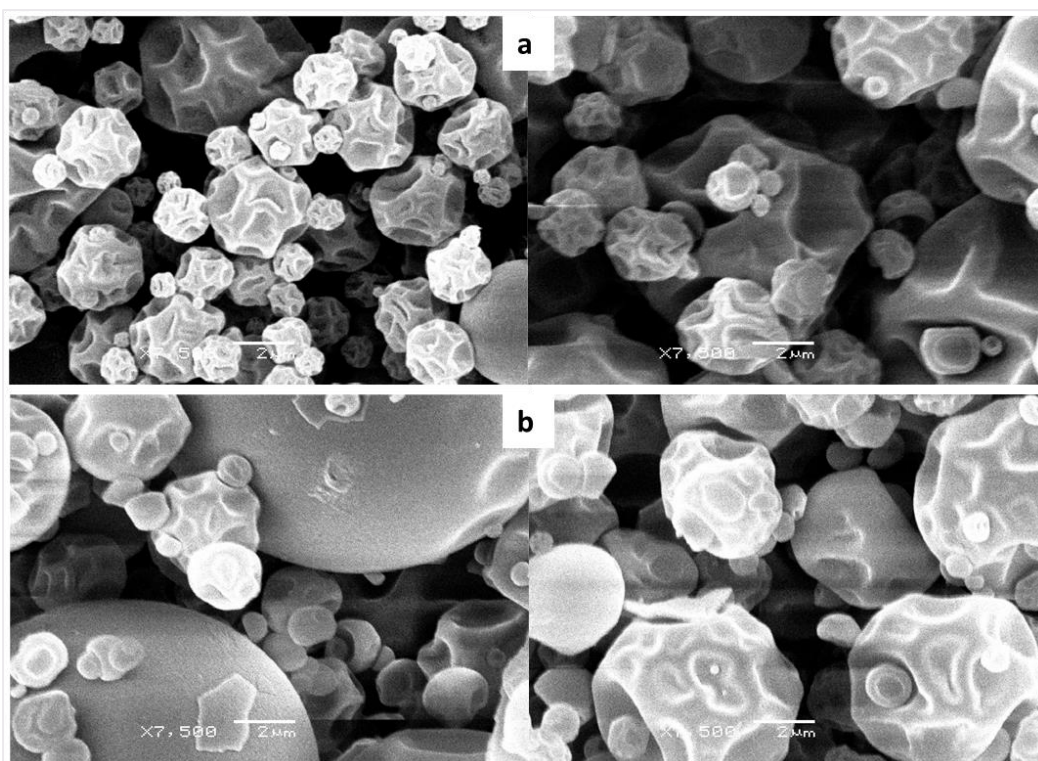


Figura 23. *Formulados en polvo de esporas de T. asperellum ILB397 con variaciones en la matriz encapsulante. (a) Trichoderma formulado con 0,15% quitosano y 5% de maltodextrina y (b) Trichoderma con 5% de maltodextrina.*

5.3. Evaluación del formulado

5.3.1. Efecto del formulado en la germinación de las semillas

5.3.1.1. Efecto del formulado sobre la germinación de semillas de trigo en sustrato artificial

Se evaluaron diferentes dosis de inoculación, en rango entre 10^3 y 10^5 esporas/semilla (Tabla 11) sobre el porcentaje de germinación de semillas de trigo, mediante la siembra en invernáculo en un sustrato compuesto por arena vermiculita y turba. La adhesión de las esporas sobre la superficie de las semillas pudo observarse en microscopio electrónico de barrido (Figura 24).

La cantidad de semillas germinadas por tratamiento al día 7 y al día 12 después de la siembra se presentan en la Tabla 12 y Figura 25. Se observó que el tratamiento de semillas con alta concentración de formulado (T1) que alcanzó $1,2 \times 10^5$ esporas/semilla, enlenteció y redujo significativamente ($p < 0,05$) la emergencia de las plántulas, como se había observado en el ensayo preliminar. Las semillas tratadas con formulado en baja concentración (T2) y esporas sin formular (T4) provocaron un efecto

priming sobre la germinación de trigo y presentaron los mejores valores de germinación durante toda la evaluación, mostrando diferencias significativas respecto al resto ($p<0,05$).

Tabla 11

Características de los tratamientos

Tratamiento	Susp. Inoculante	Esporas/semillas*	Inoculante
	Esporas/ml*		
T1 [Alta]	$2,9 \times 10^8$	$1,2 \times 10^5$	Formulado rehidratado
T2 [Media]	$3,2 \times 10^7$	$9,0 \times 10^3$	Formulado rehidratado
T3 [Baja]	$4,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^3$	Formulado rehidratado
T4	$3,9 \times 10^6$	$1,8 \times 10^3$	Esporas sin formular
T5	-	-	Solución de quitosano
T6	-	-	Agua, control

Nota. * Promedio de 2 ensayos independientes.

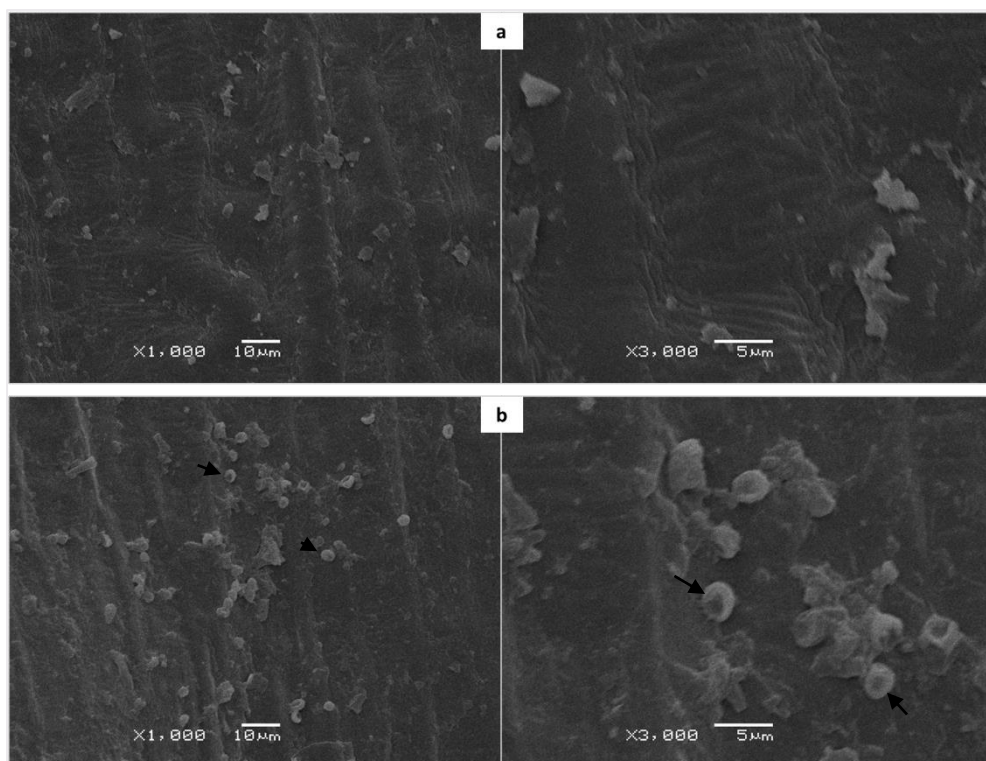


Figura 24. Superficie de semillas de trigo. (a) Semillas sin inocular, (b) semillas inoculadas con suspensión de esporas, indicadas con flechas, a partir de formulado rehidratado observadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido SEM.

Tabla 12

Germinación de semillas de trigo inoculadas con formulado a distintas concentraciones, esporas de Trichoderma sin formular, quitosano y agua, a los 7 y 12 días post siembra (DPS)

Tratamiento	Semillas germinadas %	
	7 DPS*	12 DPS*
T1 Formulado [Alta]	19 ^d	42 ^e
T2 Formulado [Media]	30 ^a	54 ^a
T3 Formulado [Baja]	20 ^d	48 ^c
T4 Esporas sin formular	31 ^a	55 ^a
T5 Quitosano	24 ^c	46 ^d
T6 Control	26 ^b	50 ^b

Nota 1. Valores promedio de semillas germinadas en dos ensayos independientes, en base a una siembra total de 96 semillas por tratamiento. Letras iguales no indican diferencias significativas $p > 0,05$.

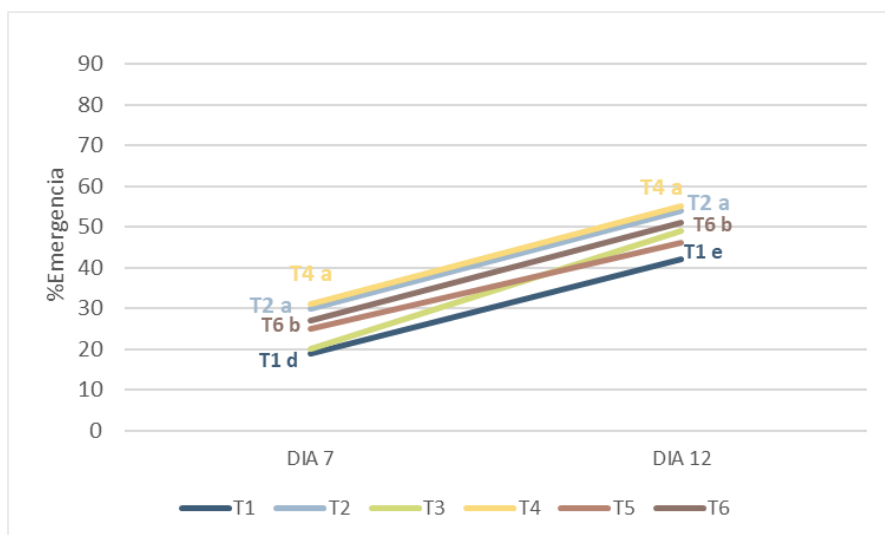


Figura 25. Porcentaje de emergencia de semillas de trigo inoculadas con distintas concentraciones de formulado de *Trichoderma* ILB397

T1- Formulado rehidratado, dosis alta.

T2- Formulado rehidratado, dosis media.

T3- Formulado rehidratado, dosis baja.

T4- Suspensión de esporas frescas de *Trichoderma* sin formular.

T5- Quitosano.

T6- Control.

5.3.1.2. Efecto del formulado sobre la germinación de semillas de arroz en invernáculo

La evaluación del efecto del formulado sobre la germinación de semillas de arroz fue realizada en invernáculo en INIA Treinta y Tres, en bandejas con suelo arrocero. Las semillas inoculadas con formulado rehidratado o con la suspensión de *Trichoderma* presentaron valores de impregnación de 1×10^5 esporas/semilla. El posible efecto *priming* se evaluó solamente en el Ensayo 1, donde no se observó diferencias entre tratamientos.

En lo que refiere a la emergencia final, no hubo diferencias significativas entre el control y el tratamiento con formulado. La cantidad de semillas germinadas promedio de los dos ensayos realizados se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13

Semillas de arroz germinadas (%) previamente inoculadas con formulado, con quitosano y con Trichoderma

Tratamiento	Germinación Final (%)
Control	60 ^a
Formulado	59 ^a
Quitosano	57 ^b
Trichoderma	55 ^c

Nota 1. Los valores son un promedio de 4 réplicas por ensayo y 2 ensayos independientes. Valores de germinación en base a un total de 96 semillas sembradas en cada unidad de conteo.

Nota 2. Letras iguales no indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

5.3.1.3. Efecto del formulado en la emergencia de arroz en campo

Para la evaluación del efecto del formulado sobre semillas de arroz en campo se realizaron ensayos en INIA Treinta y Tres con los cultivares 9193 y Merín (Figura 26). La Tabla 14 se muestran los valores de emergencia para cada tratamiento. El tratamiento F1 corresponde al formulado rehidratado a dosis alta y el F2 corresponde al tratamiento con formulado rehidratado a un orden menor. Los valores de impregnación obtenidos fueron: F1 promedio 2×10^4 y F2 promedio $1,3 \times 10^3$ esporas/semilla.

La emergencia fue significativamente mayor con el tratamiento químico, en ambos cultivares. Además, se logró un buen desempeño por parte del formulado F2 (baja dosis), en el cultivar 9193 ya que dicho tratamiento mostró un aumento en la emergencia respecto al control y al F1 (alta dosis).

Por otro lado, el análisis estadístico arrojó evidencias de un efecto negativo del tratamiento de semillas con formulado F1 (alta dosis), generando una disminución en la emergencia de plantas de arroz en ambos cultivares respecto al tratamiento control.



Figura 26. Ensayo de cultivo de arroz en el campo con semillas inoculadas con el formulado en dos concentraciones

Tabla 14

Emergencia de arroz en el campo (%) para semillas inoculadas con el formulado en dos concentraciones (F1, F2)

Tratamiento	Cultivar 9193			Cultivar MERIN		
	20 días PS	25 días PS	30 días PS	20 días PS	25 días PS	30 días PS
Control	30,58 ^c	26,25 ^c	31,00 ^c	21,25 ^b	20,67 ^b	22,42 ^b
F1 [alta]	24,50 ^d	24,08 ^d	26,83 ^d	14,92 ^c	15,25 ^c	18,67 ^c
F2 [baja]	34,42 ^b	31,50 ^b	33,00 ^b	21,75 ^b	19,25 ^b	21,83 ^b
Químico	43,75 ^a	36,00 ^a	43,50 ^a	35,17 ^a	33,00 ^a	38,58 ^a

Nota 1. Valores promedios de 3 mediciones por parcela y 4 parcelas por tratamiento, n=4.

Nota 2. Letras iguales no indican diferencias significativas $p>0,05$.

5.3.2. Efecto del formulado en la promoción de crecimiento vegetal

5.3.2.1. Efecto del formulado sobre el crecimiento de las plantas de arroz

Tanto los ensayos realizados en INIA Las Brujas con sustrato preparado como los desarrollados en INIA Treinta y Tres presentaron una impregnación de esporas por semilla en el orden de 10^5 esporas/semillas.

El análisis estadístico del peso seco aéreo de plantas de arroz presentado en la Tabla 15 determinó diferencias estadísticas entre plantas tratadas con formulado respecto al tratamiento control ($p < 0,05$).

La aplicación de formulado sobre la semilla generó un aumento de peso seco de un 52% respecto al tratamiento control. La suspensión de *Trichoderma* no mostró diferencias significativas respecto al control, pero sí se observó un aumento de peso seco aéreo del 14%.

El alto porcentaje de aumento en peso seco puede estar relacionado a las condiciones de trabajo usadas, por ejemplo, al sustrato de escasos nutrientes que redujo mucho el desarrollo vegetativo.

Tabla 15

Peso seco aéreo de plantas de arroz obtenidas con semillas sembradas en sustratos preparados, previamente inoculadas con el formulado o con Trichoderma en comparación con el control no inoculado

Tratamiento	Peso seco aéreo (g)
Formulado	$0,079 \pm 0,012^a$
Susp. <i>Trichoderma</i>	$0,060 \pm 0,006^{a,b}$
Control	$0,052 \pm 0,005^b$

Nota 1. Los valores indican el promedio de ambos ensayos, $n=20$, $\pm$ el error estándar.

Nota 2. Letras iguales no indican diferencias significativas, $p > 0,05$.

Los resultados de la evaluación estadística indicaron que no hubo diferencias entre tratamientos en la producción de biomasa seca, $p > 0,05$.

5.3.2.2. Efecto del formulado en el crecimiento de plantas de trigo

La evaluación de promoción del crecimiento de trigo con aplicación de formulado se hizo a una dosis de 10^4 esporas/semilla. Si bien el promedio del peso seco de las tres repeticiones del tratamiento con el formulado fue muy similar al tratamiento con la suspensión de esporas frescas sin formular y ambos

promedios fueron superiores al peso seco obtenido por las plantas control, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 16).

Tabla 16

Peso seco aéreo de plantas de trigo obtenidas con semillas sembradas en sustratos preparados, previamente inoculadas con el formulado o con Trichoderma en comparación con el control no inoculado

Tratamiento	Peso seco aéreo (g)
	Promedio
Formulado	0,59 ± 0,08 ^a
Susp. <i>Trichoderma</i>	0,60 ± 0,07 ^a
Control	0,54 ± 0,06 ^a

Nota 1. Valores promedios de peso seco aéreo de 10 repeticiones por ensayo. Valor promedio de 3 ensayos independientes, n=30, ± error estándar.

Nota 2. Letras iguales no indican diferencias significativas, p>0,05.

5.3.3. Efecto del formulado en el Control Biológico

5.3.3.1. Efecto del formulado en el control de enfermedad de plantas de trigo

Se utilizaron semillas de trigo susceptibles e infectadas naturalmente con *Fusarium*. Las semillas fueron inoculadas con el formulado, con esporas frescas de *Trichoderma* o con agua como control, recibieron una dosis de entre 10⁴ y 10³ esporas por semilla (Tabla 17).

Tabla 17

Impregnación de esporas de Trichoderma ILB397 formuladas y rehidratadas en agua y esporas frescas en suspensión, en semillas de trigo en tres experimentos

Tratamiento	esporas/semilla		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Formulado	1,4x10 ⁴	4,0x10 ³ *	3,8x10 ⁴
Susp. <i>Trichoderma</i>	2,3x10 ⁴	4,0x10 ³ *	3,5x10 ⁴
Control	-	-	-

Nota. *El ensayo 2 presentó un valor de impregnación inferior al resto.

En la Figura 27 se muestran los resultados obtenidos a partir de tres ensayos independientes. El tratamiento con formulado generó mayor emergencia estadísticamente significativa respecto al resto de los tratamientos. Se determinó una mayor emergencia del 15% como mínimo (E1 y E2) y 40% como máximo (E3) de las semillas inoculadas con el formulado respecto al control a los 6 días post siembra (PS). Además, las semillas inoculadas con suspensión de *Trichoderma* y con solución de quitosano presentaron valores de emergencia intermedios, inferiores a los obtenidos con el formulado, pero mayor emergencia respecto al tratamiento control.

El comportamiento de las plantas luego de 21 días post siembra (Figura 28) mostró que las semillas tratadas con formulado presentaron mejor sanidad, mostrando el mayor porcentaje de plantas sanas, menor porcentaje de plantas afectadas, y ninguna se encontraba muerta mientras que en el resto de los tratamientos sí se observaron plantas completamente muertas.

En la Figura 29 se presentan fotografías del ensayo.

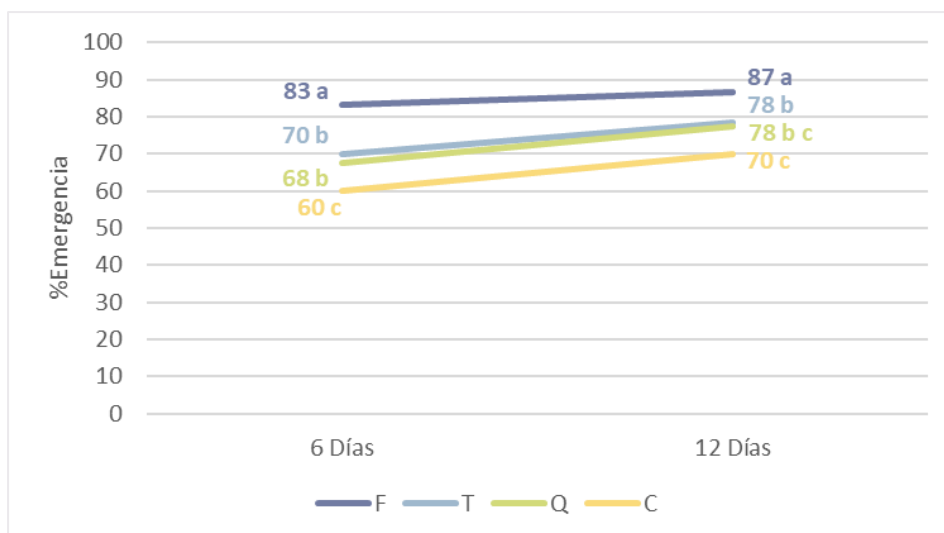


Figura 27. Emergencia de semillas de trigo del cultivar INIA Don Alberto, infectadas naturalmente con *Fusarium*. Emergencia evaluada a los 6 y 12 días de la siembra.

Letras iguales no indican diferencias significativas, $p < 0,05$. F= formulado, T= esporas de *Trichoderma* sin formular, Q= quitosano y C= control.

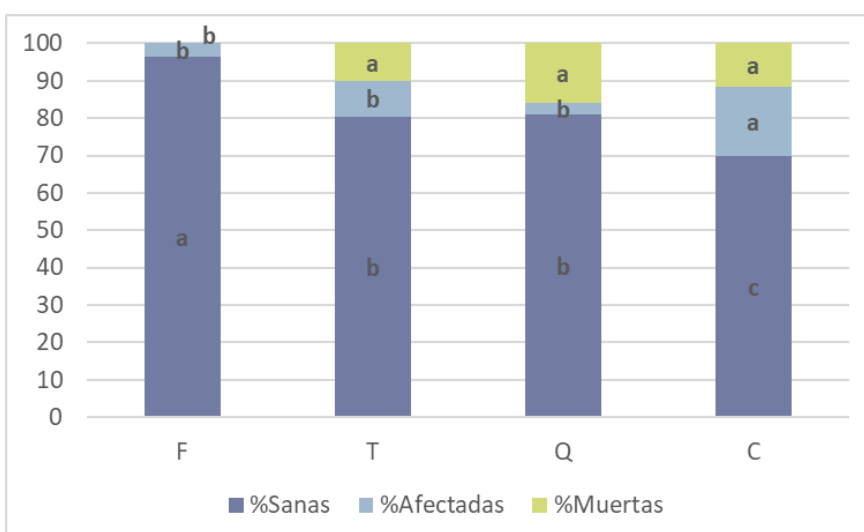


Figura 28. Porcentaje de plantas sanas, afectadas o muertas a los 21 días post siembra. Se determina planta sana aquella que presenta aspecto saludable, hojas verdes y sin síntoma de enfermedad, planta afectada la que presenta alguna hoja muerta/seca o algún síntoma de enfermedad y planta muerta aquella que emergió y murió o creció y luego murió. F= formulado, T= esporas de *Trichoderma* sin formular, Q= quitosano y C= control.

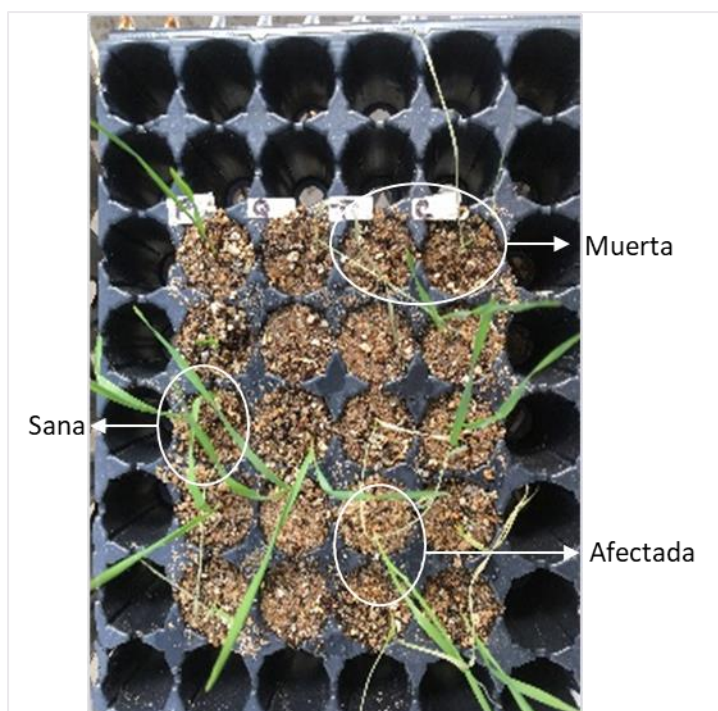


Figura 29. Síntomas en plántulas de trigo. Siembra de semillas infectadas naturalmente con *Fusarium*, inoculadas con formulado (F), quitosano (Q), esporas de *Trichoderma* sin formular (T) y control (C).

5.3.3.2. Efecto del formulado en el control de enfermedad de plantas de arroz

Se evaluó la severidad de enfermedad en plantas de arroz inoculadas con los patógenos *Nakataea oryzae* ILB425 y *Rhizoctonia oryza sativa* ILB427, plantas previamente inoculadas con formulado, esporas de *Trichoderma* sin formular y agua como control. En la Tabla 18 se presentan los resultados de impregnación de esporas tras la inoculación de semillas.

Tabla 18

Impregnación de esporas por semilla en arroz

Tratamientos	Concentración (esporas/semilla)	
	Ensayo 1	Ensayo 2
Formulado	$6,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
Susp. <i>Trichoderma</i>	$9,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$
Control	-	-

Luego de la evaluación de severidad de enfermedad en las plantas y el análisis de los resultados se determina que no hubo estadísticamente control biológico sobre el patógeno *Nakataea oryzae* ILB425. En el control del patógeno *Rhizoctonia oryzae sativa* ILB427 a pesar de no encontrar diferencias significativas entre tratamientos en la incidencia de la enfermedad, se observó un efecto positivo de reducción en la severidad de síntomas en plantas tratadas con el formulado respecto al resto de los tratamientos (Tabla 19).

En la Figura 30 se presentan imágenes de plantas inoculadas con patógenos y la presencia de síntomas.

Tabla 19

Severidad de afección de enfermedad en plantas

Tratamiento	Evaluación 1		Evaluación 2	
	<i>Nakataea</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Nakataea</i>	<i>Rhizoctonia</i>
Control	5,03 ^a	2,76 ^a	7,64 ^a	6,45 ^{a b}
Trichoderma	5,10 ^a	2,75 ^a	7,85 ^a	6,36 ^a
Quitano	5,21 ^a	2,97 ^a	8,15 ^a	6,71 ^{a b}
Formulado	4,99 ^a	2,68 ^a	7,71 ^a	6,10 ^a

Nota 1. Valores promedio de 2 ensayos independientes, con 10 repeticiones por tratamiento en cada uno de ellos, cada repetición contenía un total de 4 plantas evaluadas, n=80.

Nota 2. Letras iguales no indican diferencias significativas, p>0,05.



Figura 30. *Plantas de arroz inoculadas con patógenos*

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una tecnología para formulación de cepas de *Trichoderma* mediante el uso de *spray dryer* con el fin de obtener un producto aplicable a cultivos de alto interés económico como son el arroz y trigo, con un efecto benéfico sobre su producción. Para esto, se trabajó en la caracterización de cepas de *Trichoderma* spp. en relación a la capacidad de promoción del desarrollo vegetal, actividad antagonista sobre patógenos característicos de ambos cultivos, compatibilidad con el agente encapsulante y sinergia con éste para el control de los patógenos.

6.1. Caracterización y selección de *Trichoderma* spp.

Con el fin de obtener un formulado de *Trichoderma* con efecto positivo sobre los cultivos es importante partir de una cepa con demostrada actividad benéfica previo a su formulación. De este modo, en primer lugar, se realizaron ensayos de caracterización de cepas de *Trichoderma* spp.

Se encontraron aislados de *Trichoderma* spp. con efecto benéfico sobre las plantas, tanto en el desarrollo vegetal como en el control de patógenos.

La evaluación de promoción de crecimiento en invernáculo, en base al peso seco aéreo de las plantas, indicó que las cepas *T. asperellum* ILB397 e ILB423 y *T. harzianum* ILB421 aumentaban significativamente el crecimiento de las plantas de arroz ($p < 0,05$). En las plantas de trigo se destacó la cepa TME, seguida de las cepas ILB397 y T1C. Por lo tanto, la cepa *Trichoderma asperellum* ILB397 presentó un efecto positivo sobre el crecimiento de ambos cultivos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son consistentes con lo observado en estudios previos donde se indica que el tratamiento de plantas de arroz con cepas de *Trichoderma* tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas tratadas, aumentando significativamente componentes del crecimiento como por ejemplo la altura de plantas (Doni *et al.*, 2014). Además, se demostró un efecto destacado de *Trichoderma* sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de trigo expuestas a estrés abiótico (Zhang *et al.*, 2016). Específicamente *Trichoderma asperellum* ha sido

utilizado como hongo promotor de plantas, capaz de inducir tolerancia a la planta frente a estrés biótico y abiótico. Scudeletti *et al.*, (2021) demostraron en cultivos de caña de azúcar que la inoculación de cepas de este hongo es una herramienta importante para aliviar efectos negativos causados por la sequía. A partir de sus estudios se observó que el *T. asperellum* provocaba mejoras no solo en la nutrición y parámetros agronómicos sino también sobre el metabolismo y el rendimiento.

Tal como lo expresa Benitez *et al.* (2004) el género *Trichoderma* está compuesto por una gran variedad de especies y cepas que actúan como agentes de biocontrol, característica basada en la activación de múltiples mecanismos. Conforme a lo anterior, en el presente trabajo se determinó la capacidad antagonista de cepas de *Trichoderma* utilizando la técnica de cultivos duales en oposición a patógenos de arroz (*Nakatae oryzae* ILB425 y *Rhizoctonia oryzae sativa* ILB427) y de trigo (*Fusarium graminearum* F09005 y F02020). Los ensayos demostraron que todas las cepas evaluadas son capaces de inhibir el crecimiento de los patógenos. Las cepas aisladas de trigo *T. atroviride* TME y *T. koningiopsis* T1C previamente seleccionadas por su capacidad de control de *Fusarium graminearum* (Cabrera, 2009) presentaron, como era esperable, los mayores valores de inhibición sobre ambas cepas patógenas de trigo. Además, crecieron y esporularon sobre el micelio de ambos, ocultando completamente su presencia en la placa. Se destacaron también las cepas de *T. asperellum* ILB397 e ILB423 mostrando crecimiento y esporulación moderada sobre los dos aislamientos de *F. graminearum*. En oposición a los patógenos de arroz los resultados fueron similares, la cepa TME presentó el valor más alto de inhibición, seguida de la cepa ILB397.

Al igual que en estudios realizados por Poornima (2011) y considerando los 4 patógenos evaluados la cepa que mostró mayor actividad controladora (TME) pertenece a la especie *T. atroviride*, destacando también las cepas de *T. asperellum* ILB397 e ILB423. Ambas especies pertenecen a aquellas conocidas como las de mayor capacidad de control biológico (Mondejar, 2011).

Con el fin de caracterizar los aislamientos de *Trichoderma* se estudió la compatibilidad con el agente encapsulante a utilizar: quitosano. El quitosano es un polímero natural con capacidad de mejorar la resistencia de plantas y reducir enfermedades fúngicas. Algunos autores indican que el uso de

quitosano a cierta concentración estimula el crecimiento de cepas de *Trichoderma* e incluso que éstas poseen resistencia innata a fungicidas (Chittenden y Singh, 2009). Por el contrario, también se han descrito aislados de *T. harzianum* y *T. atroviride* altamente sensibles al quitosano al evaluar el crecimiento en distintos medios de cultivos (Palma-Guerrero *et al.*, 2008).

A partir de los ensayos realizados se determinó que medios de cultivos PDA y AA suplementados con quitosano al 0,07 y 0,1% afectaron negativamente la germinación de las cepas de *Trichoderma* evaluadas. Además el suplemento de quitosano en AA a baja concentración (0,03%) mejoró la germinación de la cepa *T. asperellum* ILB397. Por otro lado, al evaluar el efecto de la suplementación de quitosano sobre el crecimiento radial de los aislamientos de *Trichoderma*, los resultados confirman las conclusiones obtenidas en estudios de Zavala-Gonzalez *et al.* (2016), quienes determinaron diferencias entre cepas de *Trichoderma* respecto a la tolerancia al quitosano e indicaron disminución en el crecimiento de las cepas en función de la concentración de quitosano suplementada. En esta línea, en el presente trabajo la mayor tolerancia al quitosano fue presentada por la cepa T1C, seguida de las cepas ILB397 e ILB423. El resto de las cepas evaluadas, ILB421, TME y ILB424 fueron más afectadas, siendo este último el aislado más sensible a quitosano.

Los resultados obtenidos siguen la línea de lo esperado ya que las cepas ILB424 e ILB421 se han identificado como *T. harzianum* y TME como *T. atroviride*, especies previamente determinadas como sensibles al quitosano (Palma-Guerrero *et al.*, 2008; Zavala-Gonzalez *et al.*, 2016). Además, la cepa T1C, la más resistente, fue identificada como *T. koningiopsis*, especie indicada como la más tolerante al quitosano en estudios de Zavala-Gonzalez *et al.* (2016).

Los resultados del presente trabajo nos permiten reafirmar lo expresado por Hernández-Domínguez *et al.* (2021): “El género *Trichoderma* presenta gran potencial para el manejo de varios hongos fitopatógenos y es poco afectado por quitosano, características que lo hacen un buen candidato para realizar estudios de efecto aditivo o sinérgico con el biopolímero”.

Numerosos estudios han demostrado propiedades antifúngicas del quitosano sobre *Fusarium graminearum* y *Fusarium oxysporum* (Kheiri *et al.*, 2016; Palma-Guerrero *et al.*, 2008). Del mismo

modo, se demostró que el quitosano inhibe significativamente el crecimiento de las cepas patógenas de trigo *Fusarium* F09005 y F02020, mientras que los patógenos de arroz fueron más tolerantes.

Además, el uso de *Trichoderma* de forma individual redujo el crecimiento de todos los patógenos, presentando un mayor control al mostrado por el quitosano aplicado individualmente.

Los resultados obtenidos a partir del uso combinado de ambos agentes de control muestran principalmente mayor o igual inhibición respecto al uso individual de cada uno. Resultados similares fueron encontrados por Chittenden y Singh (2009), quienes demostraron que la combinación de quitosano/*Trichoderma harzianum* fue más eficaz en el control de patógenos que el quitosano o el *Trichoderma* solos, resultado que se respalda con la posibilidad de que la concentración de quitosano usada estimule el crecimiento del *Trichoderma harzianum* restringiendo así la disponibilidad de nutrientes para el patógeno.

La aplicación conjunta de quitosano con las cepas ILB397 y 423 mostró un rendimiento destacado sobre el resto de los tratamientos para el control de los patógenos evaluados.

A pesar del mayor control obtenido con la combinación de ambos controladores, no siempre se evidenció analíticamente sinergia de efectos. El análisis de *Bliss Independence* mostró que las cepas ILB397 e ILB423 fueron las únicas que mostraron sinergia con el quitosano para el control de algunos de los patógenos evaluados. El *Trichoderma* ILB397 presentó valores que indican sinergia con el quitosano para el control de F09005, ILB425 y ILB427 ($SF > 1$), mientras que el *Trichoderma* ILB423 presentó sinergia de efectos cuando se opuso a las cepas F09005 e ILB427. En forma similar, cepas de *Trichoderma asperellum* combinadas con nanopartículas de quitosano fueron efectivas contra los patógenos de plantas cultivadas: *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*, mostrando mayor inhibición del crecimiento radial respecto a la aplicación individual de *Trichoderma* (Boruah y Dutta, 2020).

Los resultados fortalecen lo observado previamente, donde los aislados ILB397, ILB423 fueron los más tolerantes al quitosano. Incluso, considerando los niveles de compatibilidad basados en la metodología planteada por la IOBC (International Organisation for Biological and Integrated Control)

(Boller y Cook, 1974), las cepas ILB397, ILB423 se presentaron como compatibles con el quitosano (APÉNDICE B) y tienen un efecto sinérgico o aditivo *in vitro* con el quitosano en el control de 3 de los 4 patógenos evaluados.

Además, podemos afirmar que la cepa ILB424 previamente confirmada como la más sensible al quitosano fue la que presentó la menor capacidad de control y resultó antagonista con el quitosano.

El efecto antagonista observado entre las cepas ILB421, ILB424, TME y el quitosano podría estar asociado a la incompatibilidad entre ellos ya que como se demostró anteriormente estas 3 cepas fueron las más sensibles al quitosano. Además, considerando el índice IOBC son incompatibles con el quitosano y por ende no deberían ser usados en simultaneo (APÉNDICE B).

Por otro lado, la concentración de quitosano utilizada había reducido la germinación de ILB397, ILB423 y T1C, siendo esta última la más afectada, mientras que, si consideramos la capacidad de crecimiento en medio suplementado con quitosano las cepas ILB397 e ILB423 fueron poco sensibles, mientras que el crecimiento de T1C no se vio alterado. Esta incidencia del quitosano sobre la germinación y/o crecimiento de las cepas podría explicar la ausencia de sinergia para el control de la totalidad de los patógenos.

Jambhulkar *et al.* (2018) detectaron que la aplicación de dos agentes de biocontrol combinados con un fungicida, a pesar de generar un efectivo control, no desarrollaba sinergia de efectos, lo cual justifican con la moderada represividad del fungicida sobre uno de los biocontroladores. Singh y Chittenden (2021) evidenciaron sinergia entre el quitosano y *Trichoderma harzianum* en el control de dos hongos testados. Este efecto lo atribuyen a la capacidad del quitosano de retrasar el crecimiento del hongo a controlar dándole tiempo al *Trichoderma* de establecerse y crecer con normalidad, reduciendo así la disponibilidad de nutrientes para el hongo invasor. A nivel celular, los autores indican la posibilidad de que el quitosano actúe como fungistático, retardando el crecimiento del hongo mediante la inducción de cambios morfológicos en la membrana y pared celular del patógeno, mientras que la presencia del *T. harzianum* podría degradar la pared celular a través de la producción de enzimas líticas. En la misma línea, se han detectado interacciones sinérgicas entre *T. atroviride* y

quitosano para el control de los patógenos *Cercospora beticola* y *Fusarium oxysporum* (Kappel *et al.*, 2022).

Otra característica importante que estudiar para la selección del *Trichoderma* fue la capacidad de multiplicarse en un medio económico y de fácil disponibilidad. En el presente trabajo se evaluó la producción en sustrato sólido usando arroz parboiled y se puede concluir que dicho sustrato es una buena opción para la producción de esporas si trabajamos con el *T. harzianum* ILB421, y los *T. asperellum* ILB397 e ILB423.

Finalmente, luego de obtener un panorama completo de las características de las cepas de *Trichoderma* se evaluó la totalidad de los resultados y se determinó *T. asperellum* ILB397 como la más adecuada para la formulación. La cepa ILB397 se seleccionó por presentar principalmente resultados positivos y beneficiosos en todas las características evaluadas.

Una vez seleccionada la cepa candidata a formular se evaluó su producción en arroz suplementado con distintas concentraciones de quitosano. En principio, la opción de producir el *Trichoderma* en un sustrato suplementado con el potencial agente encapsulante se presenta como una forma de ir adaptando la cepa a permanecer en contacto con el quitosano. Se concluyó que la producción de esporas/gramos de arroz seco se vio significativamente beneficiada por la inoculación de 0,015% de quitosano al sustrato, ya que los resultados mostraron un aumento en la producción de esporas del *T. asperellum* ILB397. Quedó pendiente verificar si esta exposición temprana al quitosano mejora también el proceso de encapsulado y conservación de las esporas con este polímero.

6.2. Formulación

Luego de la producción de las esporas de *Trichoderma* el siguiente paso fue el desarrollo del formulado, mediante el secado de la suspensión siguiendo un proceso de *spray drying* con el fin de aumentar la viabilidad del hongo durante el almacenamiento. El secado de esporas, además de su principal objetivo que es la conservación, puede mejorar el transporte del producto, la efectividad de aplicación y la persistencia del microorganismo en el campo.

La deshidratación inicial y posterior rehidratación para su aplicación son procesos que pueden dañar la viabilidad de las esporas del hongo, para su protección se implementó el uso de compuestos protectantes para el desarrollo de microencapsulados. Nuestros resultados mostraron que la viabilidad de las esporas del *Trichoderma asperellum* puede ser mantenida mediante microencapsulación con quitosano, PEG y maltodextrina. Se observó que, para una condición fija de trabajo, el secado de esporas utilizando compuestos protectores generaba un producto final con mayor viabilidad que en ausencia de ellos. Por ejemplo, trabajando a una temperatura de ingreso de 70°C y flujo de alimentación del 10% (3 mL/min) se obtuvo un producto final con 6% de sobrevivencia cuando se secó una solución de esporas de *Trichoderma* sin agentes protectores. Al secar una solución de quitosano, PEG y esporas, la sobrevivencia de estas mejoró, acercándose a un 40%. El resultado fue aún más positivo cuando se agregó maltodextrina en la suspensión a deshidratar, obteniendo una sobrevivencia del 68%. Por lo tanto, resulta evidente que el agregado de quitosano, PEG y maltodextrina juegan un papel importante en la protección de las esporas durante el *spray drying*.

Variando los valores de temperatura y flujo de alimentación se seleccionaron las condiciones más adecuadas. Los valores de trabajo seleccionados fueron 70°C para la temperatura de ingreso y flujo de alimentación 12% (3,5 mL/min), condiciones que generaron formulados con viabilidad > a 70%, sobrevivencia de esporas > a 80% y humedad cercana a 0,3 en valor de aw.

Previo al uso de maltodextrina se evaluó el encapsulado con sacarosa. Los resultados no fueron positivos ya que cuando se procesó una suspensión de esporas de *Trichoderma* con sacarosa el polvo se pegó en las paredes del equipo y no se logró obtener un producto deshidratado. Dicho problema se redujo utilizando sacarosa en conjunto con quitosano y PEG, la combinación de estos 3 compuestos resultó en un formulado con viabilidad 36%. Con el fin de evitar los problemas de incrustación y buscando mayores % de viabilidad se probó con el uso de maltodextrina, lo cual, como ya se indicó, generó mejores resultados. Braga (2019) también encontró que la adición de sacarosa como agente encapsulante proporcionaba una mayor germinación y viabilidad de los conidios de *Trichoderma asperellum* en comparación con pruebas sin uso de material protector. Sin embargo, también tuvieron

que lidiar con problemas de incrustación en la cámara de secado y en el matraz de recolección, por ello en busca de mejores resultados estudiaron otros materiales como maltodextrina, goma arábica, suero de leche y lactosa.

Finalmente se puede afirmar que se obtuvieron resultados satisfactorios en cuanto a la encapsulación y viabilidad del producto seco, utilizando una mezcla de quitosano, PEG y maltodextrina como matriz encapsulante. Sin embargo, la estabilidad del producto durante el almacenamiento no fue la esperada para un posible producto comercial. A pesar de presentar una concentración de entre 1×10^7 y 6×10^8 esporas viables/g a los tres meses de conservación a 4°C, esto representó una viabilidad cercana al 20%. Por lo tanto, es necesario continuar investigando nuevas formulaciones con el fin de mejorar la estabilidad en el tiempo, es decir aumentar la vida útil del producto. Además de las características del producto, se recomienda estudiar el uso de envases de almacenamiento adecuados y atmósferas modificadas, como por ejemplo el uso de absorbentes de oxígeno y controladores de humedad (Mascarin *et al.*, 2016).

6.3. Actividad del formulado

En una etapa final del proyecto se llevaron a cabo distintos ensayos con el fin de verificar la permanencia de efectos benéficos de la cepa de *Trichoderma* seleccionada luego de su formulación, De la misma forma que se realizó inicialmente para las cepas sin formular, se testeó la actividad del formulado sobre la germinación de plantas de arroz y trigo, la capacidad de promoción de crecimiento y su actividad como controlador biológico.

La inoculación de semillas de trigo con formulado rehidratado en agua presentó efecto positivo sobre la velocidad de germinación, generando un efecto *priming*. La mejora de la germinación fue también observada en los valores de emergencia final. Además, el formulado mejoró la germinación y sanidad de semillas infectadas o susceptibles al patógeno de trigo *Fusarium*, por lo que podríamos afirmar que el formulado disminuye el *damping off* y presenta actividad como controlador biológico de una de las enfermedades más importantes del cultivo de trigo. Sin embargo, no se puede afirmar que el

formulado mantenga la capacidad de promoción de crecimiento determinada para la cepa de *Trichoderma* previa a su formulación (sección 5.1). En estudios donde se demostró la habilidad de aislados de *Trichoderma* para el control del *damping off* inducido por *Pythium* spp. y *Rhizoctonia* sugirieron la producción de metabolitos tóxicos y micoparasitismo, a través de enzimas hidrolíticas, como mecanismos relacionados al biocontrol del *damping off* (Lifshitz *et al.*, 1986; Elad *et al.*, 1982). En arroz, la inoculación de semillas con el formulado rehidratado generó un aumento en el peso seco aéreo de plantas de arroz en invernáculo con suelo artificial, por lo que podemos concluir que se mantuvo la actividad como promotor de crecimiento. Además, a una dosis de 5×10^6 esporas/ml, la inoculación con formulado produjo un efecto positivo en la emergencia a nivel de campo, mejorando la emergencia respecto al control.

En conclusión, se cumplió con el objetivo de la formulación de esporas de *Trichoderma* mediante deshidratación por aspersión con el equipo *spray dryer*, resultando en un producto en polvo con alta viabilidad de esporas, con características que permiten un fácil manejo, almacenamiento y traslado del producto, lo cual le da un valor extra más allá de los beneficios del producto biológico en su aplicación a los cultivos de arroz y trigo. Más allá de los resultados positivos obtenidos, existen algunas variables que pueden ser modificadas en busca de mejorar el producto y su efecto sobre los cultivos. Algunas variables son técnicas como ser condiciones de trabajo del *spray dryer*, condiciones de empaquetado y almacenado. Otras variables de gran influencia son aquellas específicas de composición, como ser componentes del producto formulado y sus proporciones. Por ejemplo, la proporción del quitosano es un punto crítico ya que podría tener un efecto negativo sobre las esporas de *Trichoderma*, por lo cual sería deseable evaluar combinaciones con otras proporciones de quitosano en el formulado final. Finalmente, y muy importante, es la concentración de esporas por semilla ya que la inoculación con valores por encima del óptimo podrían generar un efecto negativo. En trigo se observó que valores por encima del óptimo (10^4 esporas/semilla), no presentan los mismos efectos positivos e incluso disminuyen la germinación de las semillas. En arroz se obtuvieron distintos efectos según las semillas sean sembradas a nivel de campo o invernáculo, en invernáculo se vio una

mayor tolerancia ya que la utilización de inóculo con 10^8 esporas/mL (10^5 esporas/semillas) no afectó la germinación ni el desarrollo de las plantas, mientras que a nivel de campo, ambiente menos controlado, se detectó un efecto negativo en la emergencia cuando se inoculó con 5×10^7 esporas/mL (2×10^4 esporas/semillas) y mejoras en la emergencia en aquellas semillas tratadas con formulado rehidratado a una concentración de 5×10^6 esporas/mL e impregnación de 10^3 esporas/semilla, lo cual significa un hallazgo muy positivo. Considerando las indicaciones de uso de los biocontroladores fúngicos comerciales como son el TRICHOSOIL® y Rhizoderma®, con valores teóricos de mínimo 10^3 y máximo $2,5 \times 10^4$ esporas/semillas, podemos concluir que efectivamente en aquellos ensayos donde se realizaron inoculaciones por encima de las recomendadas para estos productos, los resultados fueron negativos.

Considerando todo lo expresado a lo largo del presente trabajo se puede concluir que, tal como se planteaba en el objetivo inicial, se caracterizó y seleccionó al menos un aislado de *Trichoderma*, de la especie *T. asperellum* originario de suelos arroceros, con demostrada capacidad como controlador biológico de patógenos de cultivos de arroz y trigo, y como promotor del desarrollo vegetal. Además, se halló compatibilidad entre el hongo y el quitosano (agente encapsulante seleccionado para la formulación) e incluso se determinó sinergia entre ellos para el control de *Nakataea oryzae* ILB425, *Rhizoctonia oryzae sativa* ILB427 y *Fusarium graminearum* F09005. Siguiendo con los objetivos planteados inicialmente, se desarrolló una tecnología de encapsulación moderna y novedosa con resultados positivos en cuanto al producto obtenido, la concentración y viabilidad del agente biológico. El prototipo finalmente seleccionado para el formulado de esporas nos permitió la obtención de un producto con comprobados efectos benéficos sobre los cultivos de arroz y trigo.

Por otro lado, algunos resultados no fueron muy satisfactorios por lo que no todas las expectativas iniciales fueron alcanzadas. Por ejemplo, la posibilidad de obtener un formulado biológico con prolongada vida útil, característica muy importante para el desarrollo de un producto comercial. Se obtuvieron formulados con porcentajes de viabilidad menores al 20% luego de 3 meses de

almacenamiento, lo cual según nuestros criterios no son valores de viabilidad apropiados para la comercialización. Sin embargo, evaluando información del mercado se detectaron productos comerciales con aptitud para su aplicación incluso cuando la viabilidad de su agente biológico se ha reducido hasta un valor mínimo del 5%. Por lo tanto, quizás la vida útil del formulado de esporas de *Trichoderma* desarrollado no sea tan baja considerando los parámetros utilizados en el mercado.

Finalmente, podemos concluir que los resultados son auspiciosos, se logró establecer una base para que en la misma línea de trabajo se puedan desarrollar futuros productos, ajustando detalles del proceso de formulación, métodos y cantidades de aplicación sobre los cultivos, así como modificaciones en los métodos de empaquetado y conservación, con el fin de la obtención de mejoras en las características del producto final.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abreo, E., Simeto, S., Corallo, B., Martínez, G., Lupo, S. y Altier, N. (2019). *Dual selection of Beauveria bassiana strains and complex substrate media for the massive production of submerged propagules with activity against the eucalyptus bronze bug Thaumastocoris peregrinus*. Biocontrol Science and Technology 29 (6), 533-546.
- Amein, T., Omer, Z., y Welch, C. (2008). *Application and evaluation of Pseudomonas strains for biocontrol of wheat seedling blight*. Crop Protection, 27(3-5), 532–536.
- Baker, K. y Cook, R. (1974). *Biological control of plants pathogens*. Freeman, San Francisco, U.S.A. p. 433.
- Bastías, D. A., Balestrini, R., Pollmann, S. y Gundel, P. E. (2022). *Environmental interference of plant-microbe interactions*. Plant, Cell and Environment 45, 3387-3398.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. y Codón, A. C. (2004). *Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains*. Int Microbiol., 7 (4), 249–260.
- Bhaskara Reddy, M. V., Arul, J., Angers, P., y Couture, L. (1999). *Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to Fusarium graminearum and improves seed quality*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 1208-16.
- Boller, E. F., Vogt, H., Ternes, P. y Malavolta, C. (2006). *Working document on selectivity of pesticides*. Internal newsletter issued by the publication commission for the International Organisation for Biological and Integrated Control/West Palaearctic Regional Section (IOBC/wrps) council and executive committee issue, (40).
- Boonlertnirun, S., Boonraung, C., y Suvanasara, R. (2008). *Application of chitosan in rice production*. Journal of Metals, Materials and Minerals, 18, 47-52.

- Boruah, S., y Dutta, P. (2020). *Fungus mediated biogenic synthesis and characterization of chitosan nanoparticles and its combine effect with Trichoderma asperellum against Fusarium oxysporum, Sclerotium rolfsii and Rhizoctonia solani*. Indian Phytopathology, 74 (1), 81–93.
- Braga, A. (2019). *Microencapsulacao de conidios de Trichoderma asperellum por spray drying para producao de fungicida microbiológico*. [Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Uberlândia].
<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/24213>
- Cabrera, M. (2009). *Control biológico de la fusariosis del trigo* [Tesis de maestría no publicada]. Universidad de la República, Uruguay.
- Chandrika, K. S. V. P., Prasad, R. D. y Godbole, V. (2019). *Development of chitosan-PEG blended films using Trichoderma: Enhancement of antimicrobial activity and seed quality*. International Journal of Biological Macromolecules, 126, 282–290.
- Chittenden, C. y Singh, T. (2009). *In vitro evaluation of combination of Trichoderma harzianum and chitosan for the control of sapstain fungi*. Biological Control 50 (3), 262-266.
- Cuevas, V. C., Samulde, S. M. y Pajaro, P. G. (1988). *Trichoderma harzianum Rifai as activator for rapid composting of agricultural wastes*. Phil Agric, 71(4), 461-469.
- Cuevas, V. C., Sinohin, A. M. y Arro Jr., E. A. (2001). *Efficacy of Trichoderma spp. as biological control agent of Sclerotium rolfsii Sacc*. Philippine Agricultural Scientist, 84(1), 35-42.
- Da Silva, L. C. A., Honorato, T. L., Franco, T. T., y Rodrigues, S. (2010). *Optimization of Chitosanase Production by Trichoderma koningii sp. Under Solid-State Fermentation*. Food and Bioprocess Technology, 5 (5), 1564–1572.
- Dal Bello, G., Mónaco, C. y Simón, M. (2002). *Biological control of seedling blight of wheat caused by Fusarium graminearum with beneficial rhizosphere microorganisms*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 18, 627-636.
- DIEA - MGAP. (2022). *Anuario Estadístico Agropecuario del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca*. Elaborado por Oficina de Estadísticas Agropecuarias (DIEA).

- Doni, F., Isahak, A., Che Mohd Zain, C. R. y Wan Yusoff, W. M. (2014). *Physiological and growth response of rice (Oryza sativa L.) plants to Trichoderma spp. inoculants*. AMB Express 4(1).
- Dos Santos, G. F., Locatelli, G. O., Coêlho, D. A., Botelho, P. S., de Amorim, M. S., de Vasconcelos, T. C. L. y Bueno, L. A. (2015). *Factorial design, preparation and characterization of new beads formed from alginate, polyphosphate and glycerol gelling solution for microorganism microencapsulation*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 75(2), 345–352.
- Eilenberg, J., Hajek, A. y Lomer, C. (2001). *Suggestions for unifying the terminology in biological control*. Biocontrol 46:387–400.
- Elad, Y., Chet, I. and Henis, Y. (1982). *Degradation of plant pathogenic fungi by Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol. 28, 719-725.
- Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L. y Alves, A. (2013). *Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review*. Trends in Food Science & Technology, 31 (2), 138–155.
- Ezziyyani, M., Perez Sanchez, C., Ahmed, A. S, Requena, M. E. y Candela, M. E. (2004). *Trichoderma harzianum como biofungicida para el biocontrol de Phytophthora capsici en plantas de pimienta (Capsicum annuum L.)*. Anuales de Biología 26, 35-45
- Fraceto, L. F., Maruyama, C. R., Guilger, M., Mishra, S., Keswani, C., Singh, H.B. y de Lima, R. (2018). *Trichoderma harzianum-based novel formulations: potential applications for management of NextGen agricultural challenges*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 93 (8), 2056–2063.
- Harman, G. E. y Bjorkman, T. (1998). *Potential and existing uses of Trichoderma and Gliocladium for plant disease control and plant growth enhancement*. Trichoderma and Gliocladium, Volumen 2: Enzymes, biological control and commercial application, 229-265.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. y Monte, E. (2012). *Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes*. Microbiology, 158(1), 17–25.

- Hernandez Melchor, D. H., Ferrera Cerrato, R. y Alarcón, A. (2019). *Trichoderma: Importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial*. Chilean journal of agricultural and animal sciences, vol 35 (1), 98-112.
- Hernández-Domínguez, C., Vázquez-Moreno, F., Cruz-Pantoja, A. J., Orduño-Cruz, N., Domínguez-Perales, L. A. y Vázquez-Cruz, F. (2021). *Effect of Chitosan and Metabolites of Trichoderma parareesei on Fusarium oxysorum growth*. Revista Bio Ciencias e867.
- Ixanicki, N. SA., Moura, G. M., Moreno, S. G., Eilenberg, J. y Delalibera Jr, I. (2021). *Development of noel spray dried and air dried formulations of Metarhizium robertsii blastospores and their virulence against Dalbulus maidis*. Appl Microbiol Biotechnol 105 (20), 7913-7933.
- Jambhulkar, P. P., Sharma, P., Manokaran, R., Lakshman, K. D., Rokadia, P. y Jambhulkar, N. (2018). *Assessing synergism of combined applications of Trichoderma harzianum and Pseudomonas fluorescens to control blast and bacterial leaf blight of rice*. European Journal of Plant Pathology 152, 747-757.
- Jhon, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y. y Prévost, D. (2010). *Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery*. Critical Reviews in Biotechnology, 31 (3), 211-226.
- Jin, X. y Custis, D. (2011). *Microencapsulation aerial conidia of Trichoderma harzianum through spray drying at elevated temperatures*. Biological Control 56, 202-208.
- Johansson, P. M., Johnsson, L. y Gerhardson, B. (2003). *Suppression of wheat-seedling diseases caused by Fusarium culmorum and Microdochium nivale using bacterial seed treatment*. Plant Pathology 52, 219-227.
- Kakvan, N., Heydari, A., Zamanizadeh, H. R., Rezaee, S. y Naraghi, L. (2013). *Development of new bioformulations using Trichoderma and Talaromyces fungal antagonists for biological control of sugar beet damping-off disease*. Crop Protection 53, 80-84.
- Kappel, L. y Gruber, S. (2020). *Chitin and Chitosan-important structural components in Trichoderma cell wall remodeling*. New and Future Development in Microbial Biotechnology and

Bioengineering, Biomolecules production and industrial applications section. Chapter 12, 243-280.

Kappel, L., Kosa, N. y Gruber, S. (2022). *The Multilateral Efficacy of Chitosan and Trichoderma on Sugar Beet*. Journal of Fungi (Basel) 8 (2), 137.

Khan, A. A., Sinha, A. P., y Rathi, Y. P. S. (2005). *Plant growth promoting activity of Trichoderma harzianum on rice seed germination and seedling vigour*. Indian Journal of Agricultural Research, 39 (4), 256-262.

Khan, M. R., Fischer, S., Egan, D., y Doohan, F. M. (2006). *Biological control of Fusarium seedling blight disease of wheat and barley*. Phytopathology 96, 386-394.

Kheiri, A., Moosawi Jorf, S. A., Malihipour, A., Saremi, H. y Nikkhah, M. (2016). *Application of chitosan and chitosan nanoparticles for the control of Fusarium head blight of wheat (Fusarium graminearum) in vitro and greenhouse*. International Journal of Biological Macromolecules, 93, 1261–1272.

Kobori, N. N., Mascarin, G. M., Jackson, M. A. y Schisler, D. A. (2015). *Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by Trichoderma harzianum active against damping-off disease caused by Rhizoctonia solani*. Fungal Biology, 119(4), 179–190.

Lifshitz, R., Windham, M. T. and Baker, R. (1986). *Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with Trichoderma spp.* Phytopathology 76, 720-725.

Liu, C.-P., y Liu, S.-D. (2009). *Low-Temperature Spray Drying for the Microencapsulation of the Fungus Beauveria bassiana*. Drying Technology, 27 (6), 747–753.

Lopez Mondejar, R. (2011). Detección y Cuantificación de Trichoderma harzianum y Evaluación de su Actividad Biocontrol frente a la Fusariosis Vascular del Melón mediante la Aplicación de Herramientas Moleculares [Tesis de doctorado, Universidad de Alicante].
https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/22767/1/Tesis_Mondejar.pdf

Mármol, Z. (2011). *Quitina y quitosano polímeros amigables*. Revista Tecnocientífica URU, (1).

- Martínez, S. (2016). Effects of combined application of potassium phosphite and fungicide on stem and sheath disease control, yield, and quality of rice. *Crop Protection*, 89, 259–264.
- Martínez, S. y Escalante, F. (2017). *Control químico de las principales enfermedades de arroz en Uruguay*. Arroz (ACA), Vol. 17, no.92, p.48-52.
- Martínez, S., Bao, L. y Escalante, F. (2018). *Manual de identificación de enfermedades y plagas en el cultivo de arroz*. Boletín de divulgación INIA Nº 116.
- Martínez, S., Escalante, F. y Casales, L. A. (2013). *Influencia de curasemillas y fungicidas en la población de plantas, rendimiento y enfermedad de tallo*. Manejo integrado de enfermedades de arroz, capítulo 4, 10-12.
- Martínez, S., Escalante, F. y Vergara, A. (2014). *Efecto de tratamientos curasemillas en la población de plantas e implantación en el cultivar Parao*. Manejo integrado de enfermedades de arroz, capítulo 4, 13-15.
- Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Behle, R. W, Kobori, N. N. y Júnior, Í.D. (2016). *Improved shelf life of dried Beauveria bassiana blastospores using convective drying and active packaging processes*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100 (19), 8359-70.
- Mastouri, F., Björkman, T. y Harman, G. E. (2010). *Seed Treatment with Trichoderma harzianum Alleviates Biotic, Abiotic, and Physiological Stresses in Germinating Seeds and Seedlings*. *Phytopathology* 100 (11), 1213-21.
- Melgarejo, P. y De Cal, A. (2006). *Biofungicidas y control biológico de hongos fitopatógenos*. *Phytohemeroteca* 182, 59-63.
- Mew, T. W y Rosales, A. M. (1985). *Influence of Trichoderma on survival of Thanatephorus cucumenis in association with rice in the tropics*. *Ecology and Manangement of Soilborne Plant Pathogens*, 117-120.
- Mondino, P. y Vero, S. (2006). *Control biológico de patógenos en plantas*. EN: Área Agraria. 161 p.

- Olivera, V. M. y Rodríguez, D. I. (2014). *Evaluación de crecimiento, sanidad y resistencia a heladas de tres híbridos de Eucalyptus grandis con aplicación de bio estimulantes Trichoderma harzianum (Trichosoil®) y Quitosano (Biorend®) en plantación*. Universidad de la República, Uruguay.
- OPYPA. (2022). *Anuario OPYPA, Análisis sectorial y cadenas productivas, temas de política y estudios*.
- Palma- Guerrero, J., Jansson, H. B., Salinas, J. y Lopez-Llorca, L. V. (2008). *Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi*. Journal of Applied Microbiology, 104 (2), 541-553.
- Pereira, A. L. y Rossi C. 2018. *Tratamiento de semillas en el cultivo de arroz*. Revista INIA, 52 (6), 28-28.
- Pereyra, S. (2003). *Prácticas culturales para el manejo de la fusariosis de la espiga*. Jornada Técnica de cultivos de invierno. Serie Actividades de difusión N°312. INIA. p. 1-9.
- Pereyra, S., Díaz de Ackermann, M., German, S. y Cabrera, K. (2011) *Manejo de enfermedades en trigo y cebada*. Serie Técnica INIA N° 189.
- Pereyra, S., Garmendia, G., Cabrera, M., Vero, S., Pianzola, M. y Dill-Macky, R. (2005). *Control biológico de la fusariosis de la espiga de trigo y cebada*. Agrociencia, IX (1–2), 337–343.
- Pereyra, S.A., Vero, S., Garmendia, G., Cabrera, M., Pianzola, M.J. (2006). *Diversity of fungal populations associated with Fusarium head blight in Uruguay*. The Global Fusarium Initiative for International Collaboration: A Strategic Planning Workshop held at CIMMYT, p. 35-41.
- Pincirolì, M., Sisterna, M. N., Bezus, R. y Vidal, A. A. 2003. *Manchado del grano de arroz: efecto de la fertilización nitrogenada*. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata 105 (2).
- Poornima, S. (2011). *Complexity of 'Trichoderma-fusarium' interaction and manifestation of biological control*. Australian Journal of Crop Science 5 (8), 1027-1038.
- Prasad, R. D., Chandrika, K. S. V. P. y Godbole, V. (2020). *A novel chitosan biopolymer based Trichoderma delivery system: Storage stability, persistence and bio efficacy against seed and soil borne diseases of oilseed crops*. Microbiological Research 237, 162487.

- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Ravi Kumar, M. N. (2000). *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive and Functional Polymers, 46 (1), 1–27.
- Rosas, J. E., Martínez, S., Blanco, P., Perez de Vida, F., Bonnacarrère, V., Mosquera, G., ... y Gutiérrez, L. (2018). Resistance to multiple temperate and tropical stem and sheath diseases of rice. The Plant Genome, 11(1), 170029.
- Rosas, J. E., Martínez, S., Bonnacarrère, V., Pérez de Vida, F., Blanco, P., Malosetti, M., ... Gutiérrez, L. (2016). Comparison of Phenotyping Methods for Resistance to Stem Rot and Aggregated Sheath Spot in Rice. Crop Science, 56(4), 1619.
- Ruiz, R., Martinez, S., Escalante, F., Bettucci, L. y Lupo, S. (2013). *Control biológico de hongos patógenos (Sclerotium oryzae, Rhizoctonia oryzae y Rhizoctonia oryzae-sativae) en cultivos de arroz mediante cepas nativas de Trichoderma spp.* Poster presentado en el 10º Encuentro Nacional de Microbiólogos, Montevideo, Uruguay.
- Scudeletti, D., Crusciol, C. A. C., Bossolani, J. W., Moretti, L. G., Momesso, L., Servaz Tubaña, B., de Castro, S. G. Q., De Oliveira, E. F. y Hungria, M. (2021). *Trichoderma asperellum Inoculation as a Tool for Attenuating Drought Stress in Sugarcane*. Front. Plant Sci. 12:645542.
- Shahidi, F., y Han, X. (1993). *Encapsulation of food ingredients*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 33 (6), 501–547.
- Singh, H. B., Singh, B. N., Singh, S. P. y Sarma, B. K. (2012). *Exploring different avenues of Trichoderma as a potent bio-fungicidal and plant growth promoting candidate-an overview*. Plant Pathol., Vol 5, 315–426.
- Singh, T. y Chittenden, C. (2021). *Synergistic Ability of Chitosan and Trichoderma harzianum to Control the Growth and Discolouration of Common Sapstain Fungi of Pinus radiata*. Forests, 12, 542.

- Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., ... Viketoft, M. (2021). *When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications*. Journal of Pest Science, 94(3), 665–676.
- Stewart, A. y Hill, R. (2014). *Applications of Trichoderma in Plant Growth Promotion*. Biotechnology and Biology of Trichoderma, 415–428.
- Vasquez, J. A. (2010). *Caracterización microbiológica y producción de Trichoderma harzianum y Trichoderma viride en cultivo artesanal* [Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana – Bogota]. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8662>
- Villar, H.A., Vero, S., Pereyra, S., Abreo, E. y Perez, C.A. (2022). *Characterization of the antagonistic capacity of Trichoderma spp. from agricultural systems*. International Journal of Pest Management, 68 (4), 359-368.
- Vinale, F., Ghisalberti, E. L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., ... Lorito, M. (2009). *Factors affecting the production of Trichoderma harzianum secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens*. Letters in Applied Microbiology 48 705-711.
- Xu, X. M., Jeffries, P., Pautasso, M. y Jeger, M. J. (2011). *Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice*. Phytopathology 101, 1024-1031.
- Xue, A. G., Guo, W., Chen, Y., Siddiqui, I., Marchand, G., Liu, J. y Ren, C. (2017). *Effect of seed treatment with novel strains of Trichoderma spp. on establishment and yield of spring wheat*. Crop Protection, 96, 97-102.
- Zavala-Gonzalez, E. A., Lopez-Moya, F., Aranda-Martinez, A., Cruz-Valerio, M., Lopez-Llorca, L.V. y Ramírez-Lepe, M. (2016). *Tolerance to chitosan by Trichoderma species is associated with low membrane fluidity*. Journal of Basic Microbiology, 56 (7), 792-800.
- Zhang, S., Gan, Y. y Xu, B. (2016). *Application of Plant-Growth-Promoting Fungi Trichoderma longibrachiatum T6 Enhances Tolerance of Wheat to Salt Stress through Improvement of Antioxidative Defense System and Gene Expression*. Frontiers in Plant Science, 07.

APÉNDICE A. CONTROL DE PATOGENOS CON *TRICHODERMA* Y QUITOSANO

Resultados obtenidos a partir de ensayos de cultivos duales entre los patógenos y aislados de *Trichoderma*, evaluando el efecto de la suplementación del medio de cultivo con quitosano. Se evaluó la posible sinergia entre ambos controladores.

Se calculará el % de inhibición y el % de control esperado por la combinación de agentes controladores (Tabla 20, 21, 22 y 23).

Tabla 20

Control de Fusarium F09005

Día 10	% de inhibición		
Cepa	PDA	PDA + Q	% Cesp.
F09.005	0,0	17,1	17,1
ILB397	68,8	76,8	74,1
ILB421	71,5	60,9	76,3
ILB423	70,3	76,5	75,4
ILB424	56,5	19,7	63,9
TME	70,6	71,8	75,6
T1C	61,2	67,4	67,8

Nota. El % esperado de control se obtiene a partir de la fórmula del método de “Bliss independence”; $\%Cesp = A + B - (AB/100)$, control esperado al aplicarse ambos controladores en conjunto, A: control realizado por un agente controlador individual, B: control ejercido por el otro agente de control.

Tabla 21*Control de Fusarium F02020*

Día 10		% de inhibición	
Cepa	PDA	PDA + Q	% Cesp.
F02.020	0,0	53,2	53,2
ILB397	67,6	81,2	84,9
ILB421	70,6	68,2	86,2
ILB423	69,7	81,5	85,8
ILB424	67,1	67,1	84,6
TME	72,9	74,4	87,4
T1C	63,8	77,1	83,1

Tabla 22*Control de Nakataea oryzae FP1 (ILB425)*

Día 7		% de inhibición	
Cepa	PDA	PDA + Q	% Cesp.
FP1	0,0	8,8	8,8
ILB397	59,7	68,8	63,3
ILB421	60,4	40,6	63,9
ILB423	62,9	66,5	66,2
ILB424	31,2	19,1	37,2

Tabla 23*Control de Rhizoctonia oryzae sativa FP4 (ILB427)*

Día 10		% de inhibición	
Cepa	PDA	PDA + Q	% Cesp.
FP4	0,0	3,2	3,2
ILB397	66,5	76,2	67,6
ILB421	62,6	53,5	63,9
ILB423	67,4	75,3	68,4
ILB424	52,4	26,5	53,9

APÉNDICE B. COMPATIBILIDAD DEL POLÍMERO NATURAL

(QUITOSANO) CON CONTROLADOR BIOLÓGICO (*TRICHODERMA*).

La metodología planteada por la IOBC [3] explica los niveles de compatibilidad basados en el daño generado por un producto sobre los controladores biológicos. En este sentido, en condiciones de laboratorio, productos que generen una inhibición menor al 30% pueden ser considerados compatibles.

Si consideramos los resultados obtenidos en los ensayos de evaluación del efecto del quitosano sobre el crecimiento de *Trichoderma* spp. en medio PDA (Tabla 24), se puede afirmar que las cepas ILB397, ILB423 y T1C son compatibles con el quitosano. Sin embargo, las cepas ILB421, ILB424 y TME son incompatibles con el quitosano, lo que indica que no deberían ser usados simultáneamente ya que afectarían su actividad controladora.

Tabla 24

Efecto del quitosano sobre el crecimiento de cepas de Trichoderma

% inhibición	
Cepa	PDA 0,07
ILB397	17
ILB421	52
ILB423	10
ILB424	65
TME	46
T1C	0

APÉNDICE C. BIOENSAYOS DE PATOGENICIDAD *IN VIVO*

Se realizaron ensayos en invernáculo, donde se desafiaron las semillas de trigo con las cepas de los hongos patógenos (cepas de *Fusarium*). La efectiva enfermedad de las plantas se evaluó mediante control de emergencia a los 7 días después de siembra y número de plantas emergidas y sanas a los 21 días. Se realizaron 3 ensayos independientes.

Ambas cepas de *Fusarium* produjeron efecto negativo sobre las plantas de trigo (Figura 31). Por lo tanto, es posible afirmar que el sistema de inoculación usado es válido para reproducir la enfermedad de *damping off* en trigo y que ambas cepas de *F. graminearum* pueden ser causa de problemas de implantación en el cultivo de trigo.



Figura 31. Plantas de trigo sanas luego de 21 días de siembra. El % de plantas sanas es calculado respecto al total de plantas sembradas. Se considera planta sana, aquella que al momento de evaluación se encontró en buen estado, vigorosa y ausencia de indicios de enfermedad.

Para confirmar enfermedad en arroz, se desafió la parte aérea con las cepas de los hongos patógenos.

Además, se evaluó el efecto de inocular con previa herida en la zona. Con bisturí se realizó la herida y posteriormente con *film* se fijó el *plug* de agar conteniendo el patógeno.

Cuando se inoculó el patógeno con previa herida de la zona se observó síntoma de enfermedad en todas las plantas, excepto en los tratamientos control (Figura 32).



Figura 32. Síntomas en plantas de arroz inoculados con los patógenos *Nakataea oryzae* (ILB425) y *Rhizoctonia oryzae sativa* (ILB427), previa herida. Pruebas iniciales para evaluar la técnica de inoculación.

Los resultados obtenidos no han sido consistentes, el sistema de inoculación no ha sido el adecuado para reproducir la enfermedad.

En la Figura 33 y Figura 34 se puede observar plantas donde el sistema fue exitoso.



Figura 33. Plantas con síntomas causados por el patógeno *Nakataea oryzae* ILB425

Para la cepa ILB427 los resultados fueron más auspiciosos. En una primera prueba todas las macetas presentaron un resultado similar: las dos plantas tratadas con el patógeno presentaron síntoma de enfermedad y la planta control permaneció sana.

En una segunda prueba los resultados fueron muy similares, de un total de 8 plantas desafiadas con patógeno solo 3 no presentaron enfermedad. Mientras que las plantas control permanecieron todas sanas.

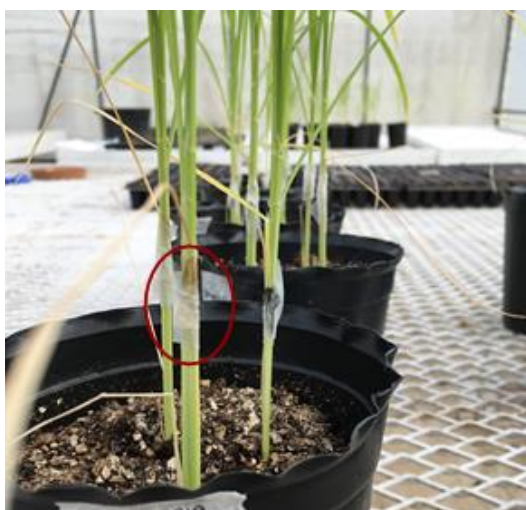


Figura 34. Planta con síntoma causado por patógeno *Rhizoctonia oryzae sativa* ILB427

Al no obtener buenos resultados en el desarrollo de la técnica, los ensayos de infección de planta de arroz se realizaron en INIA Treinta y Tres con la ayuda de Sebastián Martínez.