

Informe final publicable de proyecto

Alternativas tecnológicas para el desarrollo de insumos biológicos de uso agrícola en base a Trichoderma

Código de proyecto ANII: FSA_1_2018_1_152546

Fecha de cierre de proyecto: 01/07/2024

ABREO GIMENEZ, Eduardo Raul (Responsable Técnico - Científico)

ALBORÉS MALÁN, Silvana Victoria (Co-Responsable Técnico-Científico)

ALTIER MANZINI, Nora (Investigador)

ESTEVEZ, Marfa Belén (Investigador)

FACCIO SGIOROVELLO, Ricardo Juan (Investigador)

LUPO, Sandra (Investigador)

MARTÍNEZ KOPP, Sebastián (Investigador)

PEREYRA CORREA, Silvia Antonia (Investigador)

RAFFAELLI BERTOLOTTI, Marfa Sofia (Investigador)

RIVAS FRANCO, Federico (Investigador)

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA. INIA LAS BRUJAS (Institución Proponente) \\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA \\ INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA

Resumen del proyecto

La sostenibilidad de la producción agropecuaria depende, en gran medida, del desarrollo de soluciones tecnológicas novedosas, de impacto reducido en el ambiente, que permitan sustituir parcialmente el uso de agroquímicos y reducir los efectos negativos asociados a su uso continuado. 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. Sin embargo, si bien existen en la actualidad productos formulados en base a cepas de varias especies de este género, los sistemas de producción son artesanales, presentan dificultades para su escalamiento y control de calidad, y por lo tanto dificultan la expansión de la tecnología. En este trabajo, se buscó investigar dos alternativas tecnológicas confluyentes que permitiesen la expresión del potencial de cepas de este hongo: por un lado, lograr el microencapsulamiento de esporas del hongo para la obtención de un prototipo formulado, y por otro explorar la biosíntesis, en base a *Trichoderma*, de nanopartículas de cobre y/o plata, y su efecto sobre la planta al ser utilizadas junto con el formulado del hongo, o en forma independiente.

Se seleccionó la cepa ILB397 (TA9) de *T. asperellum* para la formulación mediante encapsulado en una matriz conteniendo quitosano y a la cepa ILB395 (TA2) de *T. harzianum* para la biogénesis de nanopartículas de plata y cobre. Los productos obtenidos demostraron actividad en la protección de los cultivos de trigo y arroz y se prevé su inclusión en proyectos futuros que permitan confirmar su actividad en diferentes condiciones agroecológicas.

Ciencias Agrícolas / Biotecnología Agropecuaria / Biotecnología Agrícola y Biotecnología Alimentaria / Microbiología agrícola

Palabras clave: microencapsulado / nanopartículas / coating /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

El uso de microorganismos en la agricultura se ha proyectado como un área de investigación y desarrollo que busca complementar las herramientas disponibles para el manejo de ecosistemas productivos de forma sustentable. Las funciones deseadas en hongos y bacterias están relacionadas al control biológico, promoción del desarrollo vegetal y su nutrición a través del ciclado de nutrientes y el aumento de su fitodisponibilidad. Si bien se reconoce que las funciones de interés son cepa-específica, existen géneros y especies que han sido particularmente estudiados en su ecología y en su funcionalidad, y que han concentrado los esfuerzos por desarrollar productos microbianos. Entre estos géneros, se destaca el género *Trichoderma*, con cepas de varias especies que han sido seleccionadas por un rango de actividades benéficas hacia los vegetales (1, 2). La investigación y desarrollo de cepas de *Trichoderma*, ya sea como biofungicidas o como promotores del crecimiento cuenta con investigaciones que cubren la biología, ecología y selección de diferentes especies (1,2,3), y otras que se concentran en su producción y desarrollo como un producto formulado y utilizable (4), incluyendo el microencapsulado de esporas como principio activo (5). Recientemente, se ha estudiado la posibilidad de producir biológicamente nanopartículas de Plata, Cobre y otros elementos, que han demostrado tener actividad antifúngica y también como promotoras del crecimiento vegetal. Entre las diversas estrategias para producirlas, se ha explorado la biogénesis a partir de hongos, y en particular *Trichoderma* (6,7). Existen más de 50 formulados de biofungicidas basados en cepas de *Trichoderma*, que constituyen el 60% de los hongos usados como biofungicidas (28). Los formulados pueden contener diferentes estructuras del hongo, obtenidas por variados métodos. La producción industrial de *Trichoderma* en sustrato sólido y en medio líquido ha sido estudiada y optimizada para algunas cepas (4) y la conservación de esporas deshidratadas y contenidas o no en granulos, logrados mediante microencapsulado, ha sido explorada (29).

Más allá de la búsqueda de cepas superiores, existen limitantes que reducen la efectividad de cualquier cepa, incluyendo la sensibilidad a la luz ultravioleta, temperaturas y humedad no adecuadas que atentan contra la persistencia en ambientes desfavorables. 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 (2). Herramientas basadas en la micro y nanotecnología, como el desarrollo de técnicas para el encapsulamiento de *Trichoderma* como ingrediente activo en diferentes matrices y también su uso para la biosíntesis de nanopartículas de metal para el control de fitopatógenos y otros efectos benéficos sobre las plantas, pueden resultar instrumentales en levantar las limitantes. El proyecto buscó desarrollar micro y nanotecnologías a partir de cepas locales de *Trichoderma*, que se encontraban preseleccionadas por su capacidad para el control biológico y la promoción del desarrollo vegetal, para ser aplicadas en cultivos de alto interés económico e impacto ambiental, de forma de maximizar la respuesta de los cultivos a las propiedades benéficas de estas cepas, mejorando la sustentabilidad del sistema.

Metodología/Diseño del estudio

La estrategia general de investigación en el desarrollo de un bioinsumo se aplica tanto para la obtención de microencapsulados de *Trichoderma* como en la biosíntesis de nanopartículas de Plata y Cobre, y ambos caminos se recorrieron en paralelo, confluyendo al final en ensayos conjuntos con los productos obtenidos. El objetivo final fue

obtener al menos un microencapsulado y un tipo de nanopartícula que puedan ser usadas separadamente o en conjunto, para maximizar su efecto positivo sobre la planta, ya sea a través de un mejor control biológico de las enfermedades o de una mejor germinación, implantación y desarrollo vegetal.

Objetivo 1 Habilidad industrial de las cepas:

Para determinar la habilidad industrial de cepas preseleccionadas de *Trichoderma*, se evaluó la capacidad de las mismas de producir esporas en arroz suplementado o no con quitosano.

Se evaluó cantidad de esporas producidas y % de esporas germinables como indicador de su viabilidad (4).

La producción en sustrato sólido se realizó en bolsas autoclavables con un filtro que permite el pasaje de gases. Para ello, se esterizaron bolsas conteniendo arroz pre-hidratado, que luego fueron inoculados con una suspensión de esporas obtenidas en placas de Petri (57) de las cepas preseleccionadas. Las bolsas se incubaron a 28°C durante 7-12 días. Las esporas fueron cosechadas en el momento de mayor número de esporas germinables/g de sustrato, mediante colecta en agua con Tween, y posteriormente deshidratadas y conservadas a varias temperaturas.

Las esporas fueron separadas de la biomasa por filtración, deshidratadas y encapsuladas mediante Spray Drying.

Objetivo 2 y 3: Microencapsulado

Para el microencapsulado, diferentes tipos de micropartículas pueden ser producidas a partir de un rango de agentes encapsuladores y mediante varios métodos de encapsulamiento, siendo interdependiente la elección de ambos (58).

Los agentes encapsuladores a evaluar fueron polímeros naturales como el quitosano, almidón, agar, sacarosa y otras sustancias usadas para el encapsulado de microorganismos (29, 59). Se verificó mediante pruebas en placa de Petri, en medio suplementado con los polímeros, que las cepas de *Trichoderma* no fuesen negativamente afectadas. Los métodos de encapsulamiento utilizados fue spray drying o secado por aspersion. En Spray Drying, la suspensión de sacarosa y otros aditivos protectores y las esporas es atomizada y deshidratada, formandose en simultaneo la cápsula protectora en torno a las esporas (60,61). En ambos casos se evaluó la eficiencia del proceso (esporas efectivamente encapsuladas), viabilidad de las esporas encapsuladas al momento de su producción y durante su conservación a diferentes temperaturas durante 12 meses (29).

Objetivos 4,5 Nanopartículas

El ensayo de biosíntesis de nanopartículas de plata y cobre se realizó en base al realizado en Sanguineto et al. (55).

Se realizó el seguimiento de la biosíntesis mediante de espectros de absorción (incluyendo el control) entre 250 y 800 nm, y midiendo el incremento de absorción en el pico de longitud de onda máximo (correspondiente a la Resonancia de Plasmón de Superficie de las nanopartículas sintetizadas) a lo largo del tiempo. Para evaluar la incidencia de las variables de la reacción en la biosíntesis de las nanopartículas se modificaron las siguientes condiciones experimentales: tiempo y temperatura de incubación del micelio con el agua, con o sin agitación, temperatura y concentración de nitrato de plata o cobre en la reacción de síntesis. Las nanopartículas fueron separadas del extracto fúngico por centrifugación, y sucesivos lavados, de manera de obtener las nanopartículas purificadas para los ensayos posteriores.

Para la caracterización de las nanopartículas biosintetizadas (estructura cristalina, forma, tamaño, topografía) además de la espectroscopía UV-visible, se utilizaron utilizar diversas metodologías: AFM, Difracción de rayos X (XRD), SEM, potencial Z, DLS, TEM. Para estudiar la composición de la capa orgánica de las NPs biosintetizadas (agente estabilizante) se utilizó Microscopía Raman Confocal.

Se estudió la estabilidad de las nanopartículas luego de someterlas a diferentes pH, fuerza iónica, liofilización, mediante la realización del espectro de absorción de la solución de nanopartículas y estudios complementarios tales como Microscopía Raman Confocal, AFM o DRX.

Se evaluó la actividad antimicrobiana in vitro de las nanopartículas biogénicas, frente a fitopatógenos de interés agrícola (*Fusarium graminearum*, *Sclerotium oryzae* y *Rhizoctonia oryzae-sativae*), mediante ensayo de difusión en agar y determinación de concentración inhibitoria mínima mediante la técnica de microdilución.

Objetivo 6 Evaluación en planta: invernáculo y campo

Las micro y nanopartículas seleccionadas fueron aplicadas mediante coating sobre la semilla (63) de arroz y trigo. Para ello, se aplicaron junto a polímeros de uso habitual a diferentes concentraciones en bolsas de nylon.

Los tratamientos consistieron en semilla tratada sólo con nanopartículas y sólo con microencapsulados de *Trichoderma*. Los controles fueron 5 y consistieron en semilla tratada con la partícula de Plata o Cobre (sin exposición a *Trichoderma*), con los polimeros usados para el microencapsulamiento, con los polimeros usados para el coating de la semillas, esporas del *Trichoderma* sin formular, y semilla sin ningún aditivo.

La evaluación inicial de promoción del crecimiento fué en condiciones de invernáculo. Se plantaron 5 semillas tratadas con cada tratamiento (3) y cada control (5) en 10 macetas de 1 litro conteniendo una mezcla en partes iguales de arena y vermiculita, totalizando 80 macetas y 400 semillas. Se registró diariamente el número de semillas germinadas. Finalmente, a los 60 días, se evaluó el peso seco de la parte aérea y raíz de cada plántula.

Ensayos de control biológico se realizaron en invernáculo (7), con la misma metodología y tratamientos, pero

desafiando a las semillas tratadas y sus controles con cepas de hongos patógenos *Fusarium graminearum* (Trigo) y *Sclerotium oryzae* y *Rhizoctonia oryzae-sativae* (arroz) de las colecciones de INIA Treinta y Tres, INIA Las Brujas, INIA Estanzuela y Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias.

Los ensayos de invernáculo se repitieron al menos tres veces, con control de temperatura y luz, en distintos momentos del año (año 3 y 4 del proyecto) en INIA Las Brujas e INIA Treinta y Tres.

Los ensayos de campo se implementaron con los mismos tratamientos y controles que en invernáculo para verificar promoción de germinación, desarrollo vegetal y control biológico en condiciones naturales. Se realizaron en las estaciones experimentales INIA La Estanzuela e INIA Treinta y Tres.

Objetivo 7 Identificación y Tipificación de cepas

Se obtuvo ADN genómico de aislamientos puros de cada cepa mediante kit Qiagen Plant and Tissue. EL ADN obtenido fue usado como molde para amplificar parcialmente el gen que codifica para el Factor de Elongación.

Los productos de PCR fueron secuenciados en ambos sentidos, y las secuencias usadas para identificar las especies mediante análisis filogenético con secuencias de especies tipo.

Resultados, análisis y discusión

MICROENCAPSULADO DE ESPORAS DE TRICHODERMA

El presente estudio se centró en la caracterización y selección de cepas de *Trichoderma* spp. con efectos benéficos sobre cultivos, específicamente en arroz y trigo, para su posterior formulación. Inicialmente, se realizaron ensayos en invernáculo para evaluar la promoción del crecimiento y la capacidad de control de patógenos, observándose que las cepas *T. asperellum* ILB397, ILB423 y *T. harzianum* ILB421 favorecieron el crecimiento de arroz, mientras que en trigo destacó la cepa ILB397. Estos resultados concuerdan con estudios previos que demostraron la capacidad de *Trichoderma* para inducir crecimiento en plantas de arroz y trigo, así como la tolerancia a estrés abiótico. Además, se evaluó la capacidad antagonista de las cepas frente a patógenos de arroz y trigo, encontrando que todas las cepas evaluadas mostraron una inhibición significativa del crecimiento de los patógenos, destacando la cepa *T. asperellum* ILB397 por su alta capacidad de control. Se determinó también la compatibilidad de las cepas con el quitosano, un polímero natural usado como agente encapsulante. Se observó que ciertas cepas, como *T. koningiopsis*, presentaron mayor tolerancia al quitosano, mientras que otras, como *T. harzianum* ILB421, fueron más sensibles. La combinación de *Trichoderma* y quitosano mostró una mayor eficacia en el control de patógenos como *Fusarium graminearum*, especialmente con las cepas ILB397 y ILB423, aunque no siempre se evidenció sinergia. En cuanto a la producción de esporas, se evaluó el uso de arroz parboiled como sustrato sólido, obteniendo buenos resultados con *T. harzianum* ILB421 y *T. asperellum* ILB397 y ILB423. Tras evaluar todas las características de las cepas, se seleccionó *T. asperellum* ILB397 como la más adecuada para la formulación debido a su rendimiento positivo en todas las pruebas. Se procedió a producir esporas en arroz suplementado con quitosano, observándose un aumento significativo en la producción de esporas con concentraciones de quitosano al 0,015%. Posteriormente, se desarrolló un formulado mediante spray drying. Se emplearon compuestos protectores como quitosano, PEG y maltodextrina para mejorar la viabilidad de las esporas tras el secado, obteniendo una sobrevivencia de hasta un 68% con la combinación de estos agentes protectores. Sin embargo, a pesar de los resultados positivos, la estabilidad del producto durante el almacenamiento no fue óptima, lo que sugiere que se deben seguir investigando nuevas formulaciones para mejorar la vida útil del producto. En cuanto a la actividad del formulado, se observó que este mantuvo sus efectos beneficiosos sobre la germinación y el crecimiento de las plantas. En trigo, el formulado mostró un efecto positivo en la velocidad de germinación y la sanidad de las plantulas de trigo. No obstante, el formulado no mantuvo la misma capacidad de promoción de crecimiento observada con la cepa sin formular. Estos resultados destacan el potencial de *Trichoderma* como biocontrolador, y la combinación con quitosano podría mejorar aún más sus efectos. Sin embargo, se requieren ajustes en las proporciones de quitosano y en la concentración de esporas por semilla para optimizar la eficacia del formulado en condiciones de campo. En general, el estudio subraya la importancia de la selección adecuada de cepas y la formulación para la obtención de productos biológicos efectivos para el control de patógenos y la promoción del crecimiento en cultivos.

BIOGENESIS DE NANOPARTICULAS A PARTIR DE CEPAS DE TRICHODERMA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA FRENTE A PATÓGENOS

Se sintetizaron nanopartículas de plata a partir de una colección de once cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de cultivos de arroz del Uruguay. Teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción y la estabilidad de las AgNPs al proceso de purificación, se continuó con la caracterización primaria y la actividad antimicrobiana con ocho de ellas.

Se seleccionaron *Trichoderma harzianum* ILB 395 (TA2) y *Trichoderma asperellum* ILB 397 (TA9), por su eficiencia en la síntesis de AgNPs, para evaluar la síntesis de nanopartículas de cobre. Además, debido a la estabilidad coloidal y su potencial antifúngico, las nanopartículas producidas por ambas cepas fueron utilizadas para realizar ensayos de tratamientos de semillas.

Se evaluaron condiciones de reacción tanto para la síntesis de AgNPs como para la de CuONPs, siendo la concentración de AgNO₃ 5mM y pH 7, respectivamente, donde se obtuvo la mayor síntesis de nanopartículas.

Las caracterizaciones complementarias por UV-vis, SEM, HR-TEM, EDS, DLS, potencial zeta y CRM de las nanopartículas metálicas sintetizadas permitieron obtener información sobre su forma, tamaño, carga y naturaleza del capping.

Las nanopartículas biogénicas presentaron actividad antifúngica frente a *R. oryzae-sativae*, *S. oryzae*, *P. oryzae* y *F. graminearum*, demostrando su potencial aplicación en el control de fitopatógenos de interés agrícola en el Uruguay.

Además, los resultados de citotoxicidad realizados con las AgNPs frente a la línea celular humana THP-1 indicaron que las concentraciones de nanopartículas que generaron un efecto de toxicidad en las células expuestas fueron en un valor superior al obtenido por la CIM.

Por último, se estudió la posibilidad de realizar un tratamiento a las semillas de arroz y trigo con AgNPs y CuONPs. Los resultados de estos ensayos fueron positivos, dado que no se observó un efecto negativo en la germinación de las semillas producto del tratamiento. Asimismo, en el caso de las semillas de trigo tratadas con AgNPs 395 y AgNPs 397 y sembradas en macetas, se observó mayor emergencia de plantines en comparación con el blanco.

Conclusiones y recomendaciones

Las estrategias seguidas para obtener microencapsulados de esporas de *Trichoderma* y nanopartículas de plata y cobre con actividad controladora de patógenos de cultivos fue exitosa ya que al menos una cepa pudo ser encapsulada (ILB397) y otra demostró gran eficiencia para la producción de nanopartículas (ILB395). Las evaluaciones *in vitro* y luego en invernáculo y campo permitieron verificar algunos efectos de estos productos en el control y promoción de crecimiento vegetal. Sin embargo, se deben continuar los estudios en campo para evaluar dosis y momentos de aplicación en diferentes condiciones agroecológicas para poder tener resultados firmes de la aplicación de estos desarrollos.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	Biogenic Silver and Copper Nanoparticles: Potential Antifungal Agents in Rice and Wheat Crops (Completo, 2023)	Sanguiñedo, P , FACCIO, R. , ABREO, E. , ALBORÉS, S	https://doi.org/https://doi.org/10.3390/chemistry5040143	https://hdl.handle.net/20.500.12008/40535	Finalizado
Libro	Tecnologías de multiplicación y formulación de cepas de trichoderma para el desarrollo de un bioinsumo de uso agrícola	Magdalena Olivera	https://hdl.handle.net/20.500.12008/42138	https://hdl.handle.net/20.500.12008/42138	Finalizado
Libro	Nanopartículas biogénicas a partir de Trichoderma spp. y su aplicación en el control de fitopatógenos de arroz y trigo	Paula Sanguiñedo	https://hdl.handle.net/20.500.12008/40535	https://hdl.handle.net/20.500.12008/40535	Finalizado

Referencias bibliográficas

- Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes. *Microbiology*. 2012;158(1):17–25.
- Singh HB, Singh BN, Singh SP, Sarma BK. Exploring different avenues of Trichoderma as a potent bio-fungicidal and plant growth promoting candidate-an overview. *Annu Rev Plant Pathol* [Internet]. 2013;(September 2016):315–426.
- Samuels GJ. Trichoderma ; Systematics, the Sexual State, and Ecology. *Phytopathology* [Internet]. 2006;96(2):195–206. Available from: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-96-0195>
- Kobori NN, Mascarin GM, Jackson MA, Schisler DA, Money N. Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by Trichoderma harzianum active against damping-off disease caused by Rhizoctonia solani 5. *Fungal Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;119(4):179–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.005>
- Locatelli GO, dos Santos GF, Botelho PS, Finkler CLL, Bueno LA. Development of Trichoderma sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. *Biol Control* [Internet]. 2018;117:21–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.020>
- Guilger M, Pasquoto-Stigliani T, Bilesky-Jose N, Grillo R, Abhilash PC, Fraceto LF, et al. Biogenic silver nanoparticles based on Trichoderma harzianum: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. *Sci Rep*. 16 de março de 2017;7
- Nandini B, Hariprasad P, Prakash HS, Shetty HS, Geetha N. Trichogenic-selenium nanoparticles enhance disease

- suppressive ability of *Trichoderma* against downy mildew disease caused by *Sclerospora graminicola* in pearl millet. *Sci Rep*. Springer US; 2017;7(1):1–11.
8. Jaklitsch WM. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Stud Mycol* [Internet]. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre; 2009;63:1–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2009.63.01>
 9. Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(1):43–56.
 10. Vinale F, Ghisalberti EL, Sivasithamparam K, Marra R, Ritieni A, Ferracane R, et al. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2009;48(January):705–11. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2009.02599.x>
 11. Lorito M, Woo SL, Harman, GE, Monte E. Translational Research on *Trichoderma*; From 'Omics to the Field. *Annu Rev Phytopathol* [Internet]. 2010;48(1):395–417. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-phyto-073009-114314>
 12. Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol*. 2004;7(4):249–60.
 13. Kubicek, R.L. Mach, C.K. Peterbauer and M. Lorito. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. C.P. Source: *Journal of Plant Pathology*, Vol. 83.
 14. Viterbo Ada, Ramot Ofir, Chernin Leonid & Chet Ilan 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens.
 15. Ruocco M, Lanzuise S, Vinale F, Marra R, Turrà D, Woo SL, et al. Identification of a New Biocontrol Gene in *Trichoderma atroviride*; The Role of an ABC Transporter Membrane Pump in the Interaction with Different Plant-Pathogenic Fungi. *Mol Plant-Microbe Interact* [Internet]. 2009;22(3):291–301. Available from: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-22-3-0291>
 16. Eziashi E, Uma N, Adekunle A, Airede C. Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. *African J Biotechnol*. 2006;5(9):703–6.
 17. Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Galán R, Collado IG. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev*. 17 de outubro de 2007;7(1):89–123
 18. Alfano, G., Ivey, M. L. L., Kahir, C., Bos, J. I. B., Miller, S. A., Madden, L. V., Kamoun, S., and Hoitink, H. A. J. 2007. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology* 97:429-437.
 19. Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S.-H., Strem, M. D., Melnick, R. L., and Bailey, B. A. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J. Exp. Bot.* 60:3279-3295.
 20. Shores, M., Mastouri, F., and Harman, G. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:21-43.
 21. Yildirim, E., Taylor, A. G., and Spittler, T. D. 2006. Ameliorative effects of biological treatments on growth of squash plants under salt stress. *Sci. Hortic. (Amst.)* 111:1-6. 70.
 22. Viterbo A, Landau U, Kim S, Chernin L, Chet I. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;305(1):42–8.
 23. Mastouri Fatemeh, Björkman Thomas, Harman G.E. (2010) Seed Treatment with *Trichoderma harzianum* Alleviates Biotic, Abiotic, and Physiological Stresses in Germinating Seeds and Seedlings. *Biological control*.
 24. Xue AG, Guo W, Chen Y, Siddiqui I, Marchand G, Liu J, et al. Effect of seed treatment with novel strains of *Trichoderma* spp. on establishment and yield of spring wheat. *Crop Prot* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;96:97–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2017.02.003>
 25. Control biológico de la fusariosis de trigo : Ing. Alim. Mónica Cabrera. (Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UdelaR).
 26. Pereyra S, Garmendia G, Cabrera M, Vero S, Pianzola M, Dill-Macky R. Control biológico de la fusariosis de la espiga de trigo y cebada. *Agrociencia*. 2005;IX(1–2):337–43.
 27. Ruiz, R.; Martínez, S.; Escalante, F.; Bettucci, L.; Lupo, S. Control biológico de hongos patógenos (*Sclerotium oryzae*, *Rhizoctonia oryzae* y *Rhizoctonia oryzae-sativae*) en cultivos de arroz mediante cepas nativas de *Trichoderma* spp. (2013). 10º Encuentro Nacional de Microbiólogos Montevideo, Uruguay.
 28. Fraceto LF, Maruyama CR, Guilger M, Mishra S, Keswani C, Singh HB, et al. *Trichoderma harzianum*-based novel formulations: potential applications for management of Next-Gen agricultural challenges. *J Chem Technol Biotechnol*. 2018;93(8):2056–63.
 29. dos Santos GF, Locatelli GO, Coêlho DA, Botelho PS, de Amorim MS, de Vasconcelos TCL, et al. Factorial design, preparation and characterization of new beads formed from alginate, polyphosphate and glycerol gelling solution for microorganism microencapsulation. *J Sol-Gel Sci Technol* [Internet]. Springer US; 2015;75(2):345–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10971-015-3705-5>
 30. Vemmer M, Patel AV. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biol Control*. 2013;67(3):380–9.
 31. Rathore S, Desai PM, Liew CV, Chan LW, Heng PWS. Microencapsulation of microbial cells. *J Food Eng*. 1o de maio de 2013;116(2):369–81.
 32. Ahluwalia V, Kumar J, Sisodia R, Shakil NA, Walia S. Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Ind Crops Prod*.

1o de abril de 2014;55(Supplement C):202–6.

33. Jin X, Custis D. (2011) Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biol Control*. 56(2):202–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.11.008>
34. Fernández-Sandoval MT, Ortiz-García M, Galindo E, Serrano-Carreón L. Cellular damage during drying and storage of *Trichoderma harzianum* spores. *Process Biochem*; 2012;47(2):186–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.10.006>
35. Witkowska D, Kancelista A, Wilczak A, Stempniewicz R, Pasławska M, Piegza M, et al. 2016. Survivability and storage stability of *Trichoderma atroviride* TRS40 preserved by fluidised bed drying on various agriculture by-products. *Biocontrol Sci Technol*. 26(12):1591–604.
36. Becaro, A.A., et al., Postharvest Quality of Fresh-Cut Carrots Packaged in Plastic Films Containing Silver Nanoparticles. *Food and Bioprocess Technology*, 2016. 9(4): p. 637-649.
37. Elgorban, A.M., et al., Antifungal silver nanoparticles: Synthesis, characterization and biological evaluation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2016. 30(1): p. 56-62.
38. Jo, Y.-K., et al., Use of silver nanoparticles for managing *Gibberella fujikuroi* on rice seedlings. *Crop Protection*, 2015. 74: p. 65-69.
39. Duran, N., et al., Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2016. 12: p. 789-799.
40. Hajipour, M.J., et al., Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 2012. 30(10): p. 499-511.
41. Balakumaran, M.D., et al., Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: Optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. *Microbiological Research*, 2016. 182: p. 8-20.
42. Shanthi, S., et al., Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. *Microbial Pathogenesis*, 2016. 93: p. 70-77.
43. Hassan, S.E.L.D., et al., New approach for antimicrobial activity and bio-control of various pathogens by biosynthesized copper nanoparticles using endophytic actinomycetes. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 2018. 11(3): p. 262-270.
44. Korbekandi, H., et al., Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using *Fusarium oxysporum*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2013. 12(3): p. 289-298.
45. Rodrigues, A.G., et al., Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013. 97(2): p. 775-782.
46. Kora, A.J., R.B. Sashidhar, and J. Arunachalam, Gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A template for the green synthesis and stabilization of silver nanoparticles with antibacterial application. *Carbohydrate Polymers*, 2010. 82(3): p. 670-679.
47. Cuevas, R.D., N.; Diez, M.C.; Tortella, G.R.; Rubilar, O., Extracellular Biosynthesis of Copper and Copper Oxide Nanoparticles by *Stereum hirsutum*, a Native White-Rot Fungus from Chilean Forests. *Journal of Nanomaterials*, 2015. 2015: p. 1-7.
48. Vanaamudan, A., H. Soni, and P. Padmaja Sudhakar, Palm shell extract capped silver nanoparticles as efficient catalysts for degradation of dyes and as SERS substrates. *Journal of Molecular Liquids*, 2016. 215: p. 787-794.
49. Mukherjee, P., et al., Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. *Nanotechnology*, 2008. 19(7).
50. Sharma, M., et al., Green Synthesis of Silver Nanoparticles with Exceptional Colloidal Stability and its Catalytic Activity Toward Nitrophenol Reduction. *Nano*, 2016. 11(04): p. 1650046.
51. Sivera, M., et al., Silver Nanoparticles Modified by Gelatin with Extraordinary pH Stability and Long-Term Antibacterial Activity. *PLoS ONE*, 2014. 9(8): p. e103675.
52. Alborés, S., et al., Purification and Applications of a Lectin from the Mushroom *Gymnopilus spectabilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014. 172(4): p. 2081-2090.
53. Barneche, S., et al., Screening for antimicrobial activity of wood rotting higher basidiomycetes mushrooms from Uruguay against phytopathogens. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2016. 18(3): p. 261-267.
54. Albores, S., et al., A Lectin Purified from Blood Red Bracket Mushroom, *Pycnoporus sanguineus* (Agaricomycetidae), Mycelium Displayed Affinity Toward Bovine Transferrin. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2016. 18(1): p. 67-74.
55. Sanguinèdo, P., et al., 2018. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using fungi and their antibacterial activity. *Nano Biomedicine and Engineering*, 2018. 10(2): p. 165-173.
56. Eloff, J.N., A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 1998. 64(8): p. 711-713.
57. Cavalcante, Rosane S., Helder L. S. Lima, Gustavo A. S. Pinto, Carlos A. T. Gava, and Sueli Rodrigues. 2008. "Effect of Moisture on *Trichoderma* Conidia Production on Corn and Wheat Bran by Solid State Fermentation." *Food and Bioprocess Technology* 1 (1): 100–104. doi:10.1007/s11947-007-0034-x.
58. Estevinho, Berta Nogueiro, Fernando Rocha, Lúcia Santos, and Arminda Alves. 2013. "Microencapsulation with Chitosan by Spray Drying for Industry Applications - A Review." *Trends in Food Science and Technology* 31 (2): 138–5. doi:10.1016/j.tifs.2013.04.001.
59. Gicheva, Gospodinka, Dilyana Paneva, Nevena Manolova, Mladen Naydenov, and Iliya Rashkov. 2012. "New Polyelectrolyte Complex of Chitosan: Preparation, Characterization, and Application as a Biocontrol Agent Carrier."

Journal of Bioactive and Compatible Polymers 27 (2): 148–60. doi:10.1177/0883911512436899.

60. John, Rojan P., R. D. Tyagi, S. K. Brar, R. Y. Surampalli, and Danielle Prévost. 2011. "Bio-Encapsulation of Microbial Cells for Targeted Agricultural Delivery." *Critical Reviews in Biotechnology* 31 (3): 211–26. doi:10.3109/07388551.2010.513327.

61. Vemmer, Marina, and Anant V. Patel. 2013. "Review of Encapsulation Methods Suitable for Microbial Biological Control Agents." *Biological Control* 67 (3): 380–89. doi:10.1016/j.biocontrol.2013.09.003

62. Eloff JN. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.* 64(8):711–3.

63 Rivas, F. 2018. A new approach for delivery of entomopathogenic fungi for plant protection against insect pests and plant diseases via maize seed coating. PhD Thesis, Lincoln University, New Zealand.

64. 1. Lübeck M, Alekhina I a., Lübeck PS, Jensen DF, Bulat S a. Delineation of *Trichoderma harzianum* into two different genotypic groups by a highly robust fingerprinting method, UP-PCR, and UP-PCR product cross-hybridization. *Mycol Res.* 1999;103(3):289–98.

65. 1. Kredics L, Chen L, Kedves O, Büchner R, Hatvani L, Allaga H, et al. 2018. Molecular Tools for Monitoring *Trichoderma* in Agricultural Environments. *Front Microbiol.* 9(July).

Licenciamiento

Reconocimiento-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-ND)

