

Recubrimiento de semillas de girasol con biopolímeros y *Trichoderma harzianum*: evaluación *in vitro* frente a patógenos fúngicos

Sunflower Seed Coating with Biopolymers and *Trichoderma harzianum*: *In Vitro* Evaluation Against Fungal Pathogens

Szemruch, C.¹, Astiz Gassó, M.¹, Sánchez, S.¹, García, F.¹, Noelting, M. C. I.², Gonçalves Vila Cova, C.¹

cszemruch@agrarias.unlz.edu.ar, astizgasso@gmail.com, ssanchez@agrarias.unlz.edu.ar,
fgarcia@agrarias.unlz.edu.ar, marianoelting@gmail.com, cgoncalves@agrarias.unlz.edu.ar

¹ Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Lomas de Zamora (CP 1836). Buenos Aires. Argentina

² Instituto Fitotécnico de Santa Catalina. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. Llavallol (CP 1832). Buenos Aires. Argentina

Recibido 22/04/2026. Aceptado: 18/05/2026

Resumen. El cultivo de girasol enfrenta el desafío constante de patógenos fúngicos que afectan su germinación y establecimiento. Una alternativa sostenible a los fungicidas químicos es el uso de agentes de biocontrol como *Trichoderma harzianum* combinados con biopolímeros naturales. El quitosano es un polímero natural con actividad antifúngica, capaz de inducir respuestas defensivas en las plantas. Por su parte, el alginato de sodio actúa como protector de los microorganismos frente a condiciones ambientales adversas. Para optimizar su aplicación resulta esencial analizar la compatibilidad de estas sustancias en distintas formulaciones, particularmente en el recubrimiento de semillas. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar *in vitro* el efecto antifúngico de formulaciones de quitosano y alginato de sodio combinadas con *Trichoderma harzianum*, aplicadas como recubrimiento de semillas de girasol frente a los patógenos *Alternaria helianthi*, *Agroathelia rolfsii* y *Colletotrichum spp.*, previamente aislados y caracterizados. Se evaluaron cuatro tratamientos: Control, Alginato de sodio 1,5 % + *Trichoderma harzianum* ($3,15 \times 10^6$ UFC g⁻¹), Quitosano 5 % y la combinación de ambos biopolímeros con el agente biológico. Se midió el crecimiento radial y se calculó la tasa de crecimiento de las colonias durante 11 días. Los resultados indicaron que la eficacia antifúngica depende del patógeno evaluado; las formulaciones que combinaron alginato de sodio con *Trichoderma harzianum* redujeron significativamente el crecimiento de los tres hongos estudiados,

mientras que el quitosano aplicado individualmente mostró un efecto inhibitorio limitado o nulo según la especie. En conclusión, la combinación de alginato de sodio y *Trichoderma harzianum* resultó efectiva para inhibir el crecimiento de estos patógenos *in vitro*. Se determinó que la eficacia de los biopolímeros evaluados está ligada a la especificidad del hongo, lo cual representa un factor clave para el diseño de futuros tratamientos de semillas.

Palabras-clave: *Alternaria helianthi*; *Agroathelia rolsfii*; *Colletotrichum* spp.; biocontrol

Abstract. Sunflower cultivation faces the constant challenge of fungal pathogens that affect seed germination and crop establishment. A sustainable alternative to chemical fungicides is the use of biological control agents such as *Trichoderma harzianum* combined with natural biopolymers. Chitosan is a natural polymer with antifungal activity and is capable of inducing plant defence responses. Sodium alginate, in turn, acts as a protective agent for microorganisms under adverse environmental conditions. To optimise their application, it is essential to assess the compatibility of these substances in different formulations, particularly for seed coating. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antifungal effect of chitosan and sodium alginate formulations combined with *T. harzianum* and applied as sunflower seed coatings against the pathogens *Alternaria helianthi*; *Agroathelia rolsfii*, and *Colletotrichum* spp., previously isolated and characterised. Four treatments were evaluated: a control, 1.5% sodium alginate + *Trichoderma harzianum* (3.15×10^6 UFC g⁻¹), 5% chitosan and the combination of both biopolymers with the biological agent. Radial growth was measured, and the micelial rate was calculated over 11 days. The results indicated that antifungal efficacy depended on the pathogen evaluated; formulations combining sodium alginate with *Trichoderma harzianum* significantly reduced the growth of the three fungi studied, whereas chitosan applied alone showed limited or no inhibitory effect, depending on the species. In conclusion, the combination of sodium alginate and *Trichoderma harzianum* effectively inhibited the growth of these pathogens *in vitro*. The efficacy of the evaluated biopolymers was pathogen-dependent, highlighting fungal specificity as a key factor.

Keywords: *Alternaria helianthi*; *Agroathelia rolsfii*; *Colletotrichum* spp.; biocontrol

Introducción

La agricultura moderna enfrenta la amenaza constante de patógenos fúngicos, que constituyen uno de los principales factores limitantes para la germinación y el establecimiento de los cultivos, particularmente en semillas de oleaginosas (Hartman et al., 2015; Kumar y Thakur, 2021; Hosseini et al., 2023). Entre estas enfermedades se destaca el complejo de *damping-off*, responsable de necrosis radicular y marchitamiento en plántulas durante sus primeras etapas de desarrollo, lo que reduce significativamente el stand de plantas y, en consecuencia, el rendimiento final del cultivo (Dorrance, 2015; Munkvold, 2017; Matthiesen y Robertson, 2023). En Argentina, la sanidad del cultivo de girasol y otras especies se ve afectada por hongos patógenos de importancia económica. Entre ellos destaca *Agroathelia rolsfii* (en su anamorfa *Sclerotium rolsfii*), causante del tizón del tallo. Esta es una enfermedad prevalente y potencialmente destructiva en las zonas productoras del país (Ivancovich y Lavilla, 2016). Asimismo, *Alternaria helianthi*, responsable de la mancha de la hoja y el tallo, ha cobrado relevancia en regiones clave como el sur de la provincia de Buenos Aires (Quiroz, 2015). Por su parte, especies del género

Colletotrichum spp. representan amenazas relevantes para la sanidad de las semillas y plántulas (Bautista-Baños et al., 2003; Hassan y Chang, 2017). Si bien no es considerado un patógeno de importancia económica para el girasol, resulta un patógeno modelo para ensayos *in vitro* de biocontrol debido a que prácticamente todas las familias botánicas cultivadas son susceptibles a una o más de sus especies (Baroncelli et al., 2017).

El control de estos patógenos se ha basado tradicionalmente en la aplicación de fungicidas de síntesis química como tratamiento de semillas. Sin embargo, su uso intensivo ha generado preocupaciones ambientales y agronómicas, incluyendo la aparición de cepas fúngicas resistentes (Fernández-Ortuño et al., 2006; Malarkodi et al., 2025), la contaminación del agroecosistema y la reducción de microorganismos benéficos en la rizósfera (Pimentel et al., 2022). En este contexto, los agentes de biocontrol se posicionan como una alternativa viable para complementar o reemplazar estas sustancias (Jiménez-Pérez et al., 2025). Entre ellos, *Trichoderma harzianum* (*T. harzianum*) ha demostrado capacidad para inhibir patógenos mediante micoparasitismo, competencia y la inducción de resistencia sistémica (Sanchez-Santos et al., 2019; Jiménez-Pérez et al., 2025).

Una estrategia clave para optimizar la eficacia del biocontrol es la integración de estos microorganismos con biopolímeros naturales mediante la tecnología de recubrimiento de semillas. Dichos polímeros actúan como matrices protectoras que favorecen el establecimiento, la adhesión y la persistencia de los agentes biológicos en la semilla y la rizósfera, además de mejorar su calidad, mantener la viabilidad y permitir una liberación controlada de esporas de *T. harzianum* (Chandrika et al., 2019; Juthi et al., 2024; Malavathu et al., 2025; Szemruch et al., 2024; Vijaykumar et al., 2024). El quitosano es considerado el segundo biopolímero natural más abundante después de la celulosa (Lidi et al., 2024; Younes y Rinaudo, 2015). Es reconocido por sus propiedades biodegradables, no tóxicas y biocompatibles (Baviskar et al., 2025; El-Araby et al., 2024) y ejerce un efecto dual como agente de control. Por un lado, posee actividad antifúngica directa que inhibe el crecimiento, la esporulación y la germinación de esporas (Kredics et al., 2024; Poznanski et al., 2023) mediante la alteración de la pared celular y la permeabilización de la membrana plasmática (Al-Hetar et al., 2011; de Oliveira Jr et al., 2012; Lopez-Moya et al., 2016; Palma-Guerrero et al., 2009). Por otro lado, actúa como agente elicitor que activa las respuestas defensivas de la planta, promoviendo la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis, como quitinasas y peroxidasas (Prasad et al., 2020; Stanley-Raja et al., 2021). El alginato de sodio es un biopolímero lineal formado por residuos de ácido β -D-mannurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) unidos por enlaces (1 \rightarrow 4). Se caracteriza por su alta viscosidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja toxicidad, además de poseer valiosas propiedades biológicas y tecnológicas (Bojorges et al., 2025). Entre las propiedades biológicas se encuentra la inducción de mecanismos de defensa en las plantas frente a bacterias, hongos y virus. Estos efectos se relacionan con la activación de la vía de señalización del ácido salicílico, la acumulación de fitoalexinas y metabolitos secundarios con actividad antipatógena, así como con el incremento de enzimas de defensa y moléculas señalizadoras (Moenne y Gonzalez, 2021). El alginato de sodio se emplea en la encapsulación de agentes biológicos para el recubrimiento de semillas, protegiendo los microorganismos frente a condiciones ambientales adversas y potenciando la eficacia antifúngica, incluso contra patógenos como *Rhizoctonia solani* (Abdukerim et al., 2024; Korbecka-Glinka et al., 2022).

Para garantizar un uso eficaz de cualquier formulación basada en biopolímeros, la implementación de un sistema de administración adecuado, constituye un factor clave para el manejo exitoso de las enfermedades de las plantas (Prasad et al., 2020). En este sentido, estudios previos han demostrado que el quitosano suprime el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* hasta en un 70-90% *in vitro* (Onaran et al., 2021), inhibe completamente el crecimiento de *Colletotrichum capsici* (Long et al., 2017) y reduce la incidencia de *Alternaria solani* (Guo et al., 2006; Ramkissoo et al., 2016). Aunque formulaciones como el Cu-quitosano han demostrado plena compatibilidad con *T. harzianum* (Sangeetha et al., 2025), su aplicación mediante recubrimiento puede reducir la viabilidad del hongo, lo que hace necesario incluirlo en una capa protectora combinada con alginato de sodio (Szemruch et al., 2022). Si bien existen amplios antecedentes a nivel global, en Argentina y la región sudamericana el uso conjunto de biopolímeros y *Trichoderma* enfocado en el recubrimiento de semillas ha sido escasamente reportado. En la región se ha demostrado el éxito de la encapsulación de *Trichoderma* en matrices poliméricas para preservar su actividad biocontroladora frente a patógenos en cultivos como el cacao en Ecuador (Avilés et al., 2023) y para mejorar su persistencia y actividad enzimática en Brasil (Maruyama et al., 2020).

En consecuencia, el presente estudio tiene como objetivo evaluar *in vitro* el efecto antifúngico del quitosano y el alginato de sodio en formulaciones combinadas con *T. harzianum*, aplicadas como recubrimiento de semillas de girasol. De este modo, se busca establecer una relación coherente entre la caracterización de los patógenos y la validación experimental de una estrategia integrada de biocontrol basada en biopolímeros. Los resultados permitirán determinar la contribución intrínseca de las formulaciones combinadas de quitosano, alginato de sodio y *T. harzianum*, reforzando el potencial de los biopolímeros como herramientas innovadoras para optimizar la eficacia de los tratamientos biológicos.

Materiales y Métodos

Aislamiento

Durante la campaña 2024/2025, se procedió a la recolección de tejidos vegetales con síntomas evidentes, principalmente manchas necróticas, en plantas de girasol ubicadas en el campus de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora (UNLZ) siguiendo los criterios de muestreo sintomatológico descritos por Di Feo et al. (2025). El aislamiento y la purificación de los hongos fitopatógenos se realizaron siguiendo metodologías clásicas de fitopatología (Agarwal y Sinclair, 1996). En el caso de *Alternaria helianthi* (*A. helianthi*) y *Colletotrichum* spp., se empleó un bisturí para recortar fragmentos de tejido enfermo (aproximadamente 5 × 5 mm) del borde avanzado de las lesiones. Luego se procedió a la desinfección sumergiéndolos en alcohol 70 % por 30 segundos, seguido de una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % y un triple enjuague con agua destilada estéril, protocolo ajustado para la obtención de cultivos axénicos según Agarwal y Sinclair (1996). Finalmente, cada fragmento se transfirió a una caja de Petri (90 x 15 mm) con medio agar papa glucosa (APG) y se incubó a 25 °C durante 7 días. En el caso de *Agroathelia rolfsii* (*A. rolfsii*) el micelio se obtuvo a partir de esclerocios desinfectados y sembrados en APG en las cajas de Petri siguiendo la metodología de Chandra Sekhar et al. (2020).

Purificación

Luego del período de incubación, los aislamientos fueron purificados mediante repiques sucesivos desde el borde activo de la colonia. Para ello, se realizó un corte con bisturí estéril en la zona de crecimiento activo, el cual se transfirió axénicamente a medio APG e incubó hasta su esporulación (aproximadamente 5-7 días). En el caso de *A. helianthi*, se empleó además la técnica de dilución para la obtención de cultivos monospóricos siguiendo los procedimientos descritos por French y Hebert (1982). Este procedimiento se repitió 3 veces hasta obtener colonias uniformes, consideradas como cultivos puros. Posteriormente, se realizó una identificación presuntiva/morfológica mediante la evaluación de caracteres macro y microscópicos. A nivel macroscópico se registraron características distintivas (color, margen, textura), mientras que a nivel microscópico se observaron estructuras vegetativas y reproductivas mediante preparados en fresco. Las características diagnósticas consideradas para la identificación se presentan en la Tabla 1 (Barnett y Hunter 1998, Chandra Sekhar et al., 2020, Vasava y Gohel, 2024):

Tabla 1.

Principales características de los patógenos evaluados.

Característica	<i>Alternaria helianthi</i>	<i>Colletotrichum spp.</i>	<i>Agroathelia rolfsii</i>
Tipo de hifa	Hifas septadas, pigmentadas (dematiáceas)	Hifas septadas, hialinas	Hifas septadas, hialinas
Estructuras reproductivas	Conidióforos simples o ramificados que producen conidios en cadena	Acérvulos con conidios y setas oscuras	No forma conidios; produce esclerocios
Conidios / esporas	Conidios multicelulares, con septos transversales y longitudinales (muriformes), con pico apical	Conidios hialinos, unicelulares, cilíndricos	No presenta conidios; estructuras de supervivencia: esclerocios
Otras estructuras diagnósticas	Cadenas de conidios y pigmentación oscura	Setas oscuras emergiendo de acérvulos	Esclerocios esféricos o irregulares
Color de colonia (cultivo)	Oliva oscuro a negro	Salmón	Blanco algodonoso al inicio; luego con esclerocios marrón oscuro
Estructuras visibles en preparado fresco	Conidios muriformes en cadenas	Conidios hialinos y setas en acérvulos	Hifas hialinas y esclerocios jóvenes

El patógeno *Agroathelia rolfsii* (citado frecuentemente en la literatura como *Sclerotium rolfsii*) fue identificado por la formación de esclerocios marrón oscuro (Kumar y Thakur, 2021). Se optó por la nomenclatura de *Agroathelia* por ser la clasificación actual, aunque se reconoce que la mayoría de los antecedentes sobre biocontrol y biopolímeros para esta especie están registrados bajo su nombre anterior (Kumar y Thakur, 2021).

Determinación de la patogenicidad

Se sembraron semillas de girasol desinfectadas superficialmente en macetas con sustrato esterilizado, mantenidas en cámara de crecimiento a 25 °C con un fotoperiodo de 12 h luz/oscuridad. A los 10 días se realizó el raleo, dejando una planta por maceta. Para garantizar la precisión en el momento de la inoculación, se definieron los estados fenológicos de las plántulas siguiendo la escala fenológica de girasol (Schneider y Miller, 1981). La inoculación de *A. rolfsii* se efectuó mediante la colocación de discos de micelio (0,5 cm) obtenidos de colonias en APG alrededor de las raíces de plántulas de 15 días. *A. helianthi* se inoculó en plantas de 40 días mediante pulverización de una suspensión de conidios (1×10^6 esporas ml^{-1}) sobre ambas caras de las hojas. En el caso de *Colletotrichum* spp. se practicó una herida en la inserción foliar con aguja hipodérmica y se aplicaron 0,1 ml de suspensión conidial. En los ensayos con *A. helianthi* y *Colletotrichum* spp., las plantas se cubrieron con polietileno para mantener humedad relativa superior al 95 %. Los síntomas se evaluaron mediante la observación de lesiones, pudrición basal y marchitez. La evaluación y posterior re-aislamiento del agente causal se realizaron con el propósito de verificar los postulados de Koch y validar el inóculo, siguiendo los lineamientos metodológicos de Agarwal y Sinclair (1996) y Vasava y Gohel, (2024).

Tratamientos

Se utilizó una formulación comercial en polvo de *T. harzianum* (Th1-INTA) con $3,15 \times 10^6$ UFC/g en una dosis de 3 g por kg de semillas. Asimismo, se emplearon dos biopolímeros: alginato de sodio y quitosano de peso molecular medio ambos provenientes de Sigma Aldrich®. El alginato de sodio se utilizó como agente adhesivo diluido en agua al 1,5 % (p/v). El quitosano se empleó diluido en ácido acético (1 % v/v) en una concentración del 5 % (p/v). Para garantizar su esterilidad, previo a la realización de los tratamientos, las semillas fueron autoclavadas a 120 °C por 20 minutos. Este procedimiento se realizó con el fin de utilizar la semilla exclusivamente como una matriz portadora inerte (*carrier*), eliminando la interferencia de otras variables como la viabilidad del embrión, las respuestas de defensa fisiológicas de la semilla viva y la interferencia de la microbiota epífita o endófito nativa. De este modo, se garantizó un sustrato orgánico estandarizado donde la reducción o control del patógeno es atribuible únicamente a la acción directa de los tratamientos evaluados, bajo un principio de exclusión biológica en bioensayos (Agarwal y Sinclair, 1996; Arora et al., 2010; Cook y Baker, 1983).

Las sustancias se combinaron en las formulaciones y secuencias de recubrimiento según los tratamientos que se indican en la Tabla 2. El recubrimiento fue realizado colocando 40 ml de las soluciones de manera progresiva sobre 300 g de semillas de girasol, mantenidas en rotación continua durante 3 min, con el objetivo de asegurar una distribución, adhesión y absorción homogéneas. En el tratamiento control (T1), las semillas fueron tratadas con 40 ml de agua destilada estéril. El tratamiento con dos capas (T4) requirió 30 minutos de secado entre ellas. Posteriormente, se efectuó un secado de 24 h a temperatura ambiente, tras lo cual las semillas se almacenaron en bolsas de papel a 10 °C.

Tabla 2.

Tratamientos y secuencia de recubrimiento en semillas de girasol

Tratamiento	Primer capa	Segunda capa
T1	Control (agua destilada)	----
T2	Alginato de sodio + <i>T. harzianum</i>	----
T3	Quitosano al 5 %	----
T4	Quitosano al 5 %	Alginato de sodio + <i>T. harzianum</i>

La elección de los tratamientos evaluados en este estudio constituye una primera aproximación experimental orientada específicamente a determinar el desempeño y la eficacia de formulaciones biopoliméricas frente a patógenos fúngicos. El diseño priorizó la funcionalidad y viabilidad tecnológica del sistema de biocontrol ya que investigaciones previas detectaron que el quitosano, aplicado en contacto directo con *T. harzianum*, reduce la viabilidad de sus esporas (Szemruch et al., 2022; Szemruch et al., 2024). En este contexto, la inclusión del alginato de sodio en las formulaciones combinadas (T2 y T4) es fundamental, ya que actúa como una película protectora que aísla al agente de biocontrol del efecto dañino del quitosano (Szemruch et al., 2022). Bajo esta premisa, se omitieron tratamientos de interacción directa sin protección para priorizar formulaciones tecnológicamente viables. Esta estrategia de recubrimiento permite no solo mejorar la adherencia de los propágulos a la semilla, sino también preservar su actividad enzimática y capacidad antagonista frente a los patógenos evaluados (Szemruch et al., 2022; Szemruch et al., 2024).

Inhibición fúngica *in vitro* con semillas recubiertas

Para evaluar la eficacia directa de las formulaciones sobre el avance del patógeno se realizó un ensayo de inhibición *in vitro* modificado a partir de la metodología descrita por Crovo y Clemente (2015). De cada uno de los cultivos puros se extrajo un disco de 5 mm y se colocó en el centro de placas de 90 x 15 mm con medio APG. Alrededor de estos y en forma equidistante, se colocaron 5 semillas de girasol en cada una de las placas. La distancia entre las semillas y el disco de patógeno dependió de la tasa de crecimiento evaluada en un ensayo previo, siendo de 5,08; 18,0 y 8,18 mm d⁻¹ para *A. helianthi*, *A. rolfsii*, y *Colletotrichum* spp. respectivamente. Luego se incubaron a 25-28 °C. Para cada patógeno, se evaluó el crecimiento mediante la medición del radio de colonización expresado en mm, cada 24 horas durante 11 días desde la siembra. A partir de esos datos se calcularon las siguientes variables:

- Tasa de crecimiento: se calculó para cada una de las repeticiones a partir de la pendiente de la recta de crecimiento lineal mediante el método de mínimos cuadrados (Pollard, 1977) en el programa Excel, utilizando la siguiente fórmula:

$$b = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Donde:

n = número de observaciones

x = días

y = radio

- Radio final: Crecimiento radial acumulado (expresado en mm) al undécimo día de incubación, momento que marcó la finalización del ensayo y el límite del avance del patógeno hacia las semillas.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció bajo un diseño completamente aleatorizado (DCA) con arreglo factorial 4 (tratamientos) × 3 (patógenos), considerando cada placa de Petri como unidad experimental y cuatro repeticiones por combinación. Se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) empleando el software estadístico Navure Team 2023.

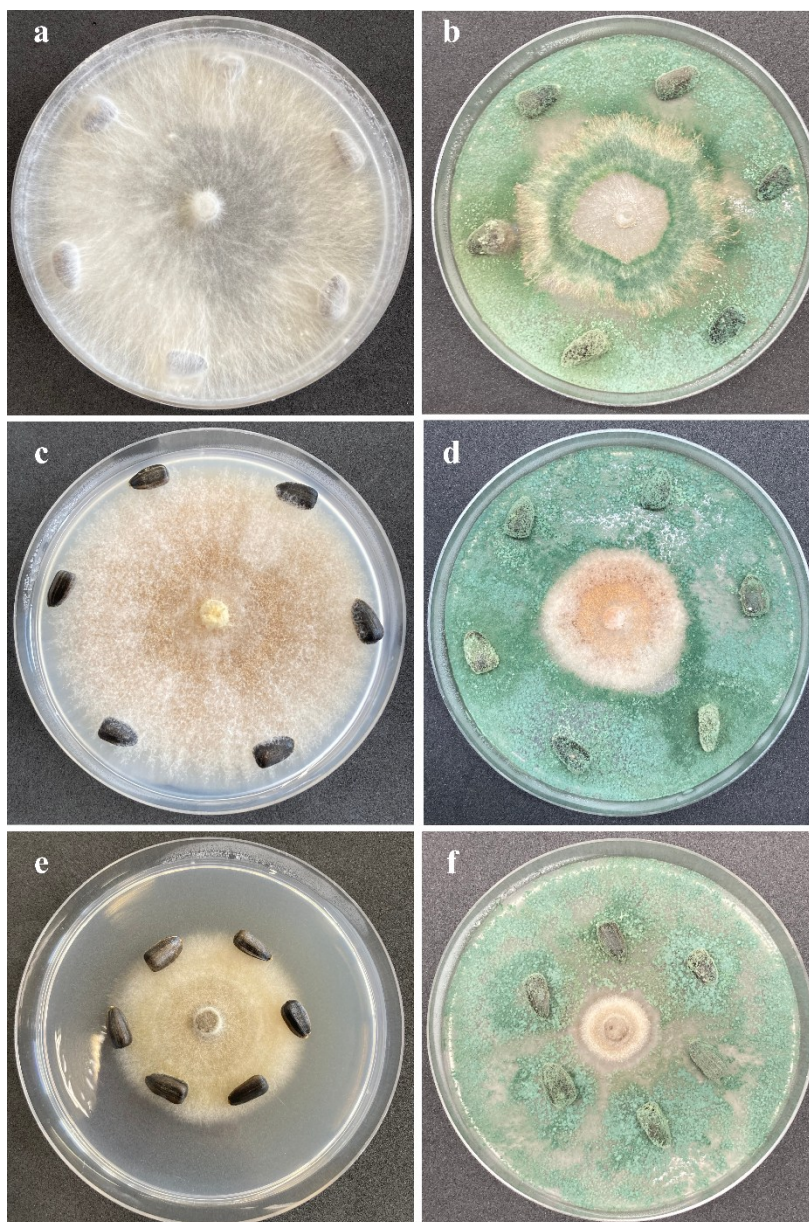
Resultados y discusión

Los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de plantas de girasol infectadas confirmaron su capacidad patogénica al reproducir los síntomas característicos en plántulas inoculadas artificialmente. Habiendo cumplido los postulados de Koch, estas cepas purificadas (*Alternaria helianthi*; *Agroathelia rolfsii*; *Colletotrichum* spp) fueron seleccionadas para los ensayos de inhibición *in vitro*. Al enfrentar estos patógenos a las semillas recubiertas, la interacción significativa patógeno x tratamiento ($p < 0,05$) para ambas variables analizadas indicó que la eficacia antifúngica de las formulaciones evaluadas dependió del patógeno considerado. Este comportamiento diferencial sugiere mecanismos de sensibilidad específicos en cada especie fúngica frente a los componentes de las formulaciones.

El análisis macroscópico de los enfrentamientos evidenció que en las placas testigo todos los patógenos: *A. rolfsii* (Figura 1.a), *Colletotrichum* spp. (Figura 1.c) y *A. helianthi* (Figura 1.e) crecieron sin restricciones. En el tratamiento T4 (Quitosano 5% + Alginato 1.5% + *T. harzianum*); se observó en todos los casos la emergencia y colonización del biocontrolador desde las semillas, lo que resultó en una limitación del avance micelial de los patógenos (Figuras 1.b, 1.d y 1.f). Esta inhibición visual es consistente con la reducción significativa de la tasa de crecimiento (Tabla 3) y el radio final (Tabla 4), lo que confirma la capacidad de la matriz de biopolímeros para facilitar la acción antagonista del agente biológico.

Figura 1.

Inhibición fúngica in vitro con semillas recubiertas



Nota: (a,c,e) Testigo T1 recubrimiento con agua destilada; (b,d,f) Tratamiento T4 compuesto por Quitosano 5%, Alginato 1,5% + *T harzianum*. Las filas muestran los enfrentamientos correspondientes a los patógenos *A. rolfsii* (a,b), *Colletotrichum* spp. (c,d) y *A. helianthi* (e,f).

En *A. rolfsii*, los tratamientos que incluyeron alginato de sodio + *T. harzianum* (T2 y T4) redujeron significativamente tanto la tasa de crecimiento como el radio final (Tablas 3 y 4). Esto sugiere que el efecto inhibitorio estaría principalmente asociado a la actividad antagonista de *T. harzianum* posiblemente mediante competencia por espacio y nutrientes o producción de metabolitos antifúngicos. El quitosano aplicado individualmente (T3) difirió del control en la tasa de crecimiento, pero no en el radio final alcanzado (Tablas 3 y 4). En *A. helianthi* la ausencia del efecto inhibitorio del quitosano y el incremento observado en el radio final (Tabla 4) bajo el tratamiento T3 podría indicar una baja sensibilidad de este patógeno al biopolímero en las condiciones evaluadas. En contraste, la combinación de alginato de sodio con *T. harzianum* (T2 y T4) produjo una marcada reducción del crecimiento (Tablas 3 y 4).

Tabla 3.

Tasa de crecimiento (mm/día) para los tres patógenos evaluados

Patógeno	Tratamiento	Descripción del Tratamiento	Tasa de crecimiento (mm/d)
<i>A. rolfsii</i>	Control	Agua destilada	14,13 ± 0.61 a
	T2	Alginato + <i>T. harzianum</i>	11,00 ± 0.19 c
	T3	Quitosano 5%	13,25 ± 0.32 b
	T4	Quitosano 5% + Alginato 1.5% + <i>T. harzianum</i>	11,07 ± 0.24 c
<i>A. helianthi</i>	Control	Control (Agua)	3,31 ± 0.32 a
	T2	Alginato + <i>T. harzianum</i>	2,23 ± 0.23 b
	T3	Quitosano 5%	3,75 ± 0.13 a
	T4	Quitosano 5% + Alginato 1.5% + <i>T. harzianum</i>	2,25 ± 0.17 b
<i>Colletotrichum spp.</i>	Control	Control (Agua)	7,39 ± 0.15 a
	T2	Alginato + <i>T. harzianum</i>	6,55 ± 0.63 bc
	T3	Quitosano 5%	7,31 ± 0.12 ab
	T4	Quitosano 5% + Alginato 1.5% + <i>T. harzianum</i>	6,26 ± 0.38 c

Resultados del ANOVA para la interacción: $F = 12.68$; $p < 0.0001$; $gl = 6$. Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$)

En *Colletotrichum spp.*, la respuesta fue diferencial según la variable considerada. La tasa de crecimiento (Tabla 3), se redujo únicamente en T4 con respecto al control, mientras que T2 mostró un comportamiento intermedio y T3 no difirió del control. Sin embargo, al analizar el radio final (Tabla 4), tanto T2 como T4 disminuyeron significativamente el crecimiento en comparación con el control y T3. Esta discrepancia entre variables sugiere que el efecto inhibitorio en este patógeno se manifiesta de manera progresiva y resulta más evidente al considerar el crecimiento acumulado. En este caso, la formulación combinada (T4) fue la que mostró el efecto más consistente.

Tabla 4

Radio final de la colonia (mm) al día 11 de medición para los tres patógenos evaluados

Patógeno	Tratamiento	Descripción del Tratamiento	Radio Final (mm)
<i>A. rolfsii</i>	Control	Agua destilada	85,00 ± 0.00 a
	T2	Alginato + <i>T. harzianum</i>	55,88 ± 0.75 b
	T3	Quitosano 5%	85,00 ± 0.00 a
	T4	Quitosano 5 % + Alginato 1,5 % + <i>T. harzianum</i>	55,50 ± 0.58 b
<i>A. helianthi</i>	Control	Control (Agua)	36,04 ± 3.05 b
	T2	Alginato + <i>T. harzianum</i>	16,00 ± 0.71 c
	T3	Quitosano 5%	41,52 ± 1.26 a
	T4	Quitosano 5 % + Alginato 1,5 %+ <i>T. harzianum</i>	16,75 ± 0.87 c
<i>Colletotrichum spp.</i>	Control	Control (Agua)	76,04 ± 1.68 a
	T2	Alginato + <i>T. harzianum</i>	35,25 ± 1.04 b
	T3	Quitosano 5 %	76,06 ± 1.68 a
	T4	Quitosano 5 % + Alginato 1,5 % + <i>T. harzianum</i>	36,37 ± 1.11 b

Resultados del ANOVA para la interacción: $F = 71.61$; $p < 0.0001$; $gl = 6$. Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$)

El análisis de los resultados revela una marcada eficacia de las formulaciones basadas en alginato de sodio incorporando *T. harzianum* (T2 y T4) para inhibir el crecimiento de *A. helianthi*, *A. rolfsii*, y *Colletotrichum spp.* Esta respuesta es consistente con lo reportado por Phuengsanthia et al. (2024), quienes demostraron que la encapsulación de *T. harzianum* en alginato de sodio alcanza un porcentaje de inhibición de hasta un 86,27 % contra diversos patógenos. Aunque en este trabajo no se determinaron los procesos fisiológicos directos, la literatura sugiere que el éxito de esta combinación podría explicarse por los múltiples mecanismos de acción descritos para el agente biológico, tales como el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia por nutrientes y espacio (Vitti et al., 2022). En este sentido, la eficacia observada en nuestro estudio se vería reforzada por la capacidad del alginato de sodio para actuar como matriz protectora que favorece la supervivencia y la persistencia de los microorganismos de biocontrol (Abdukerim et al., 2024). Tal como indican Avilés et al. (2023), Szemruch et al. (2022) y Maruyama et al. (2020), la estabilidad de estas formulaciones poliméricas es fundamental, ya que permiten preservar la viabilidad de las esporas y la actividad enzimática del hongo antagonista frente a condiciones adversas, permitiendo además una posible liberación gradual de esporas (Chandrika et al., 2019), optimizando así el biocontrol observado *in vitro*

Por otro lado, los resultados obtenidos con el quitosano aplicado individualmente (T3) presentan una discrepancia notable con respecto a la literatura consultada. Mientras que el quitosano no mostró un efecto antifúngico significativo en el presente estudio, autores como Sangeetha et al. (2025) reportaron inhibiciones del 44,81 % contra *S. rolfsii* utilizando compuestos de Cu-quitosano. De igual manera, Onaran et al. (2021) demostraron que diferentes tipos de quitosano inhiben fuertemente el crecimiento de *S. sclerotiorum* y *F. oxysporum*. En concordancia, Zohara et al. (2019) y Long et al. (2017) empleando quitosano hidrosoluble observaron una supresión drástica del crecimiento micelial en *Phytophthora capsici* y *Colletotrichum capsici*, respectivamente. Incluso se ha reportado que derivados específicos del quitosano, como las bases de Schiff de carboximetilquitosano, poseen una capacidad inhibitoria superior

a la del quitosano puro frente a patógenos como *F. oxysporum* y *A. solani* (Guo et al., 2006). Turkan et al., (2023), utilizando una matriz de quitina y metilcelulosa con *Trichoderma viride*, lograron restringir significativamente el crecimiento de patógenos como *Colletotrichum* spp. La falta de efectividad en el presente estudio podría explicarse por variaciones en la fluidez de la membrana plasmática del patógeno. Según Debnath et al. (2022), hongos con baja fluidez y ácidos grasos saturados presentan resistencia natural al quitosano, el cual requiere de una interacción electrostática con cargas negativas para permeabilizar la membrana y causar la muerte celular.

A pesar de los beneficios observados, persisten incógnitas respecto a la interacción molecular en estas formulaciones de biopolímeros. Entre ellas, la especificidad de la respuesta del huésped y del patógeno ante diferentes matrices. Por ejemplo, mientras que el alginato de sodio es valorado por su capacidad de liberación sostenida, el quitosano puede interferir en la percepción de las señales de defensa de la planta (Prasad et al., 2020) o reducir la viabilidad de las esporas de *T. harzianum* (Szemruch et al., 2022). Además, es necesario considerar la pureza química y el grado de desacetilización que determinan la efectividad del quitosano para actuar como biocida (Debnath et al., 2022). Por otro lado, si bien estos resultados *in vitro* son prometedores, la persistencia y el comportamiento de estas formulaciones podrían verse modificados en condiciones reales debido a las complejas dinámicas propias del suelo y la rizósfera.

Conclusiones

En las condiciones *in vitro* evaluadas, la combinación de alginato de sodio y *T. harzianum* resultó efectiva para inhibir el crecimiento micelial de *A. helianthi*, *A. rolfsii*, y *Colletotrichum* spp. El quitosano individualmente aplicado mostró un efecto antifúngico limitado y dependiente del patógeno. La eficacia de las formulaciones con estos biopolímeros no puede generalizarse entre especies, lo que resalta la importancia de considerar la especificidad del patógeno en el diseño de futuros tratamientos de semillas.

Referencias bibliográficas

- Abdukerim, R., Li, L., Li, J.-H., Xiang, S., Shi, Y.-X., Xie, X.-W., Chai, A.-L. y Fan, T.-F. (2024). Coating seeds with biocontrol bacteria-loaded sodium alginate/pectin hydrogel enhances the survival of bacteria and control efficacy against soil-borne vegetable diseases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 279(Part 3), 135317. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135317>
- Agarwal, V. K., y Sinclair, J. B. (1996). Principles of seed pathology (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781482275650>
- Al-Hetar, M. Y., Zainal Abidin, M. A., Sariah, M. y Wong, M. Y. (2011). Antifungal activity of chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Journal of Applied Polymer Science*, 120, 2434–2439. <https://doi.org/10.1002/app.33455>
- Arora, N. K., Khare, E., y Maheshwari, D. K. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria: constraints in bioformulation, commercialization, and future strategies. En D. K. Maheshwari (Ed.), Plant growth and health promoting bacteria (pp. 97-116). Microbiology Monographs, vol 18. Springer, Berlin, Heidelberg. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-13612-2_5#citeas

- Avilés, D., Espinoza, F., Villao, L., Alvarez, J., Sosa, D., Santos-Ordóñez, E. y Galarza, L. (2023). Application of microencapsulated *Trichoderma* spp. against *Moniliophthora roreri* during the vegetative development of cocoa. *Scientia Agropecuaria*, 14(4), 539-547. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2023.045>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (4th ed.). APS Press.
- Baroncelli, R., Talhinhos, P., Pensec, F., Sukno, S. A., Le Floch, G., y Thon, M. R. (2017). *The Colletotrichum acutatum* Species Complex as a Model System to Study Evolution and Host Specialization in Plant Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02001>
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bósquez-Molina, E. y Wilson, C. L. (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, 22(8), 1087–1092. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00117-0)
- Baviskar, S. B., Raut, R. A., Shende, P. V., Madke, V., Kamdi, S., Mahentesh, V. y Shivran, A. (2025). Chitosan is an efficient tool for precision agriculture and sustainability: A review. *Plant Archives*, 25(1), 1679–1695. <https://doi.org/10.51470/plantarchives.2025.v25.no.1.244>
- Bojorges, H., López-Rubio, A., Martínez-Abad, A. y Fabra, M. J. (2025). Functional and bioactive properties of the protein-polysaccharide extracts from brown algae: Exploring novel functional ingredients. *Food Hydrocolloids*, 162, 110967. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110967>
- Chandra Sekhar, J., Mishra, J. P., Prasad, R., Reddy, V. P., Kumar, S., Thakur, A., Sharma, R., Pal, J., y Teja, M. B. S. (2020). Favorable morphological and cultural conditions for mycelial growth of *Sclerotium rolfsii* (curzi) C.C Tu y Kimber, causing stem blight of tomato. *International Journal of Chemical Studies*, 8(3), 1389-1396. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i3s.9391>
- Chandrika, K. S. V. P., Prasad, R. D. y Varsha, G. (2019). Development of chitosan-PEG blended films using *Trichoderma*: Enhancement of antimicrobial activity and seed quality. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.208>
- Cook, R. J., y Baker, K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. American Phytopathological Society.
- Crovo, V. y Clemente, G. E. (2015). Eficacia de fungicidas de síntesis y biológico en base a *Trichoderma harzianum* para controlar patógenos de semillas de soja. *Revista FAVE - Ciencias Agrarias*, 14(2), 1-13 <https://doi.org/10.14409/fa.v14i2.5720>
- Debnath, D., Samal, I., Mohapatra, C., Routray, S., Kesawat, M. S. y Labanya, R. (2022). Chitosan: An autocidal molecule of plant pathogenic fungus. *Life*, 12(11), 1908. <https://doi.org/10.3390/life12111908>
- de Oliveira Jr., E. N., de Melo, I. S. y Franco, T. T. (2012). Changes in hyphal morphology due to chitosan treatment in some fungal species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55, 637–646. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000500001>
- Di Feo, L. del V., Giayetto, A., y Rodríguez Pardina, P. E. (Comps.). (2025). *Técnicas de detección de fitopatógenos* (1.ª ed. adaptada). Patricia Elsa Rodríguez Pardina.
- Dorrance, A. E. (2015). *Phytophthora root and stem rot*. In G. L. Hartman, J. C. Rupe, E. J. Sikora, L. L. Domier, J. A. Davis y K. L. Steffey (Eds.), *Compendium of soybean diseases and pests* (5th ed., pp. 73–76). The American Phytopathological Society.

- El-Araby, A., Janati, W., Ullah, R., Ercisli, S. y Errachidi, F. (2024). Chitosan, chitosan derivatives, and chitosan-based nanocomposites: Eco-friendly materials for advanced applications (a review). *Frontiers in Chemistry*, 11, 1327426. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1327426>
- Fernández-Ortuño, D., Pérez-García, A., López-Ruiz, F., Romero, D., de Vicente, A. y Torés, J. A. (2006). Occurrence and distribution of resistance to QoI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 215–222. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9014-7>
- French, E. R., y Hebert, T. T. (1982). Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)
- Guo, Z., Chen, R., Xing, R., Liu, S. y Yu, H. (2006). Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities *in vitro*. *Carbohydrate Research*, 341(3), 351–354. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.11.002>
- Hartman, G. L., Rupe, J. C., Sikora, E. J., Domier, L. L., Davis, J. A. y Steffey, K. L. (2015). *Compendium of soybean diseases and pests* (5th ed.). The American Phytopathological Society
- Hassan, O. y Chang, T. (2017). Chitosan for eco-friendly control of plant disease. *Asian Journal of Plant Pathology*, 11(2), 53–70. <https://doi.org/10.3923/ajppaj.2017.53.70>
- Hosseini, B., Voegelé, R. T. y Link, T. I. (2023). Diagnosis of soybean diseases caused by fungal and oomycete pathogens: Existing methods and new developments. *Journal of Fungi*, 9(5), 587.
- Ivancovich, A. J., y Lavilla, M. (2016). Diagnóstico y manejo de enfermedades en girasol. Ediciones INTA. https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/bitstream/handle/20.500.12123/160/diagnostico_y_manejo_de_enfermedades_en_girasol.pdf
- Jiménez-Pérez, O., Gallegos-Morales, G., Castro-del Ángel, E., Hernández-Castillo, F. D. y Castillo-Reyes, F. (2025). Fungicidal activity of chitosan in synergy with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* for the control of chili wilt disease. *Agrociencia*, 59(1), 1–13. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v59i1.3059>
- Juthi, Z. T., Jabeen, M., Islam, M. R., Biswas, P. y Ahmed, S. (2024). Biopolymer-based coating materials for antiviral and antifungal applications: Recent advances in formulations and characterization. *Chemical Engineering Journal*, 498, 155000. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.155000>
- Korbecka-Glinka, G., Piekarska, K. y Wiśniewska-Wrona, M. (2022). The use of carbohydrate biopolymers in plant protection against pathogenic fungi. *Polymers*, 14(14), 2854. <https://doi.org/10.3390/polym14142854>
- Kredics, L., Büchner, R., Balázs, D., Allaga, H., Kedves, O., Racić, G., Nagy, A., Varga, J., Manczinger, L. y Sipos, G. (2024). Recent advances in the use of *Trichoderma*-containing multicomponent microbial inoculants for pathogen control and plant growth promotion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(5), 162. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03965-5>
- Kumar, R. y Thakur, N. B. (2021). *Sclerotium rolfsii*: A soil-borne fungal menace to crop production. *International Journal of Botany Studies*, 6(6), 1471–1475.
- Lidi, M. W., Cahyaningrum, H. y Uge, E. (2024). Chitosan as a plant pathogen control agent: A review. *Agro Bali: Agricultural Journal*, 7(2), 319–332. <https://doi.org/10.37637/ab.v7i2.1562>
- Long, L. T., Tan, L. V., Boi, V. N., y Trung, T. S. (2017). Antifungal activity of water-soluble chitosan against *Colletotrichum capsici* in postharvest chili pepper. *Journal of Food Process Preservation*, 41(e13339). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13339>

- Lopez-Moya, F., Kowbel, D., Nueda, M. J., Palma-Guerrero, J., Glass, N. L. y Lopez-Llorca, L. V. (2016). *Neurospora crassa* transcriptomics reveals oxidative stress and plasma membrane homeostasis genes as key targets in response to chitosan. *Molecular BioSystems*, 12, 391–403. <https://doi.org/10.1039/C5MB00649J>
- Malarkodi, K., Divya, V., Natarajan, K., Navamaniraj, K. N., Ganesan, K., Bhaskaran, M. y Kavitha, S. (2025). Assessing the effects of chitosan on groundnut (*Arachis hypogaea* L.) growth and productivity. *Legume Research – An International Journal*, 48(12), 2070–2076. <https://doi.org/10.18805/LR-5266>
- Malavathu, K., Godbole, V., Singh, A., Chandrika, K. S. V. P. y Prasad, R. D. (2025). Porous biopolymer matrices: Advanced seed delivery platforms for beneficial microbes to combat soilborne diseases. *ACS Omega*, 10(20), 20723–20731. <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c01710>
- Maruyama, C. R., Bilesky-José, N., de Lima, R., y Fraceto, L. F. (2020). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* preserves enzymatic activity and enhances the potential for biological control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 225. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00225>
- Matthiesen, R. L. y Robertson, A. E. (2023). Effect of infection timing by four *Pythium* spp. on soybean damping-off symptoms with and without cold stress. *Plant Disease*, 107(12), 3975–3983. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-23-0082-RE>
- Moenne, A. y González, A. (2021). Chitosan-, alginate-carrageenan-derived oligosaccharides stimulate defense against biotic and abiotic stresses, and growth in plants: A historical perspective. *Carbohydrate Research*, 503, 108298. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2021.108298>
- Munkvold, G. P. (2017). Fusarium species and their associated mycotoxins. In R. H. Proctor (Ed.), *Mycotoxigenic fungi: Methods and protocols* (pp. 51–106). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_4
- Navure Team. (2023): Navure (3.0.0): A data-science-statistic oriented application for making evidence-based decisions. Software. Available from: <https://www.navure.com/inicio/>
- Onaran, A., Bayar, Y., Karakurt, T., Tokatli, K., Bayram, M. y Yanar, Y. (2021). Antifungal activity of chitosan against soil-borne plant pathogens in cucumber and a molecular docking study. *Journal of Taibah University for Science*, 15(1), 852–860. <https://doi.org/10.1080/16583655.2021.2006434>
- Palma-Guerrero, J., Huang, I. C., Jansson, H. B., Salinas, J., Lopez-Llorca, L. V. y Read, N. D. (2009). Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy-dependent manner. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 585–594. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.02.010>
- Phuengsanthia, K., Bussaman, P., Namsena, P. y Sa-uth, C. (2024). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* with sodium alginate and evaluation of efficacy against fungal plant pathogen. *Food Agricultural Sciences and Technology*, 10(3), 55-67. <https://doi.org/10.14456/fast.2024.20>
- Pimentel, M. F., Arnao, E., Warner, A. J., Rocha, L. F., Subedi, A., Elsharif, N., Chilvers, M. I., Matthiesen, R., Robertson, A. E., Bradley, C. A., Neves, D. L., Pedersen, D. K., Reuter-Carlson, U., Lacey, J. V., Bond, J. P. y Fakhoury, A. M. (2022). Reduction of *Pythium* damping-off in soybean by biocontrol seed treatment. *Plant Disease*, 106(9), 2403–2414. <https://doi.org/10.1094/pdis-06-21-1313-re>
- Pollard, J. H. (2009). Simple linear regression and the method of least squares (Cap. 15). En *A Handbook of Numerical and Statistical Techniques* (pp. 255–274). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511569692.016>

- Poznanski, P., Hameed, A. y Orczyk, W. (2023). Chitosan and chitosan nanoparticles: Parameters enhancing antifungal activity. *Molecules*, 28(7), 2996. <https://doi.org/10.3390/molecules28072996>
- Prasad, R. D., Chandrika, K. 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, 126487. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126487>
- Quiroz, F. J. (2015). *Impacto de enfermedades foliares del girasol y herramientas para el manejo de Alternaria helianthi y Phoma macdonaldii en el Sudeste Bonaerense* [Tesis doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata] Repositorio Institucional INTA. <https://repositorio7.inta.gov.ar/bitstreams/7590ddca-ad95-45ed-a515-0339d19b06c4/download>
- Ramkisson, A., Francis, J., Bowrin, V., Ramjegathesh, R., Ramsuhag, A. y Jayaraman, J. (2016). Bioefficacy of a chitosan-based elicitor on *Alternaria solani* and *Xanthomonas vesicatoria* infections in tomato under tropical conditions. *The Annals of Applied Biology*, 169(2), 274–283. <https://doi.org/10.1111/aab.12299>
- Sanches-Santos, M., Nogueira, M. A. y Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: Reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9, 205. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>
- Sangeetha, B. M., Bharati Bhat, N., Prasad, R. D., Dinesh Kumar, V., Supriya, K. y Chandrika, K. S. V. P. (2025). Effect of Cu-chitosan composite based seed coating on seed quality enhancement and antifungal activity. *International Journal of Economic Plants*, 12(3), 01-06. <https://doi.org/10.23910/2/2025.5982>
- Stanley-Raja, V., Senthil-Nathan, S., Chanthini, K. M. P., Sharmila, P. y Selvaraj, T. (2021). Biological activity of chitosan inducing resistance efficiency of rice (*Oryza sativa* L.) after treatment with fungal-based chitosan. *Scientific Reports*, 11, 20488. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99391-w>
- Schneider, A. A., & Miller, J. F. (1981). Description of sunflower growth stages. *Crop Science*, 21(6), 901–903
- Szemruch, C., Astiz Gassó, M. M., García, F., Sanchez, S., Martinez, P. M. y Cerdá, M. (2022). Biopolymer and *Trichoderma harzianum* compatibility for sunflower seed coating. *Journal of Experimental Research*, 10(4), 203–212.
- Szemruch, C. L., Astiz Gassó, M. M., García, F. A., Gonçalves Vila Cova, C., Sánchez, S., Ibáñez, Y. y Colinas, A. (2024). Canola seeds coating with formulations based on sodium alginate, chitosan and *Trichoderma harzianum*. *Journal of Plant Protection Research*, 64(1), 61–68. <https://doi.org/10.24425/jppr.2024.149156>
- Turkan, S., Mierek-Adamska, A., Kulasek, M., Konieczna, W. B. y Dąbrowska, G. B. (2023). New seed coating containing *Trichoderma viride* with anti-pathogenic properties. *PeerJ*, 11, e15392. <https://doi.org/10.7717/peerj.15392>
- Vasava, D., y Gohel, N. M. (2024). Eco-friendly management of *Alternaria* leaf blight of sunflower caused by *Alternariaster helianthi* (Hansford) E. G. Simmons. *International Journal of Advanced Biochemistry Research*, 8(8), 1095-1102. <https://doi.org/10.33545/26174693.2024.v8.i8So.1997>
- Vijaykumar, S., Rajeswari, B., Kavya, M., Chandrika, K. S. V. P., Prasad, R. D., Prasanna, S. L. y Yadav, S. K. (2024). Programmable chitosan-based double layer seed coating for biotic and abiotic-stress

- tolerance in groundnut. *International Journal of Biological Macromolecules*, 275, 133586. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133586>
- Vitti, A., Bevilacqua, V., Logozzo, G., Bochicchio, R., Amato, M. y Nuzzaci, M. (2022). Seed coating with *Trichoderma harzianum* T-22 of Italian durum wheat increases protection against *Fusarium culmorum*-induced crown rot. *Agriculture*, 12(5), 714. <https://doi.org/10.3390/agriculture12050714>
- Younes, I. y Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13(2), 1133–1174. <https://doi.org/10.3390/md13021133>
- Zohara, F., Surovy, M. Z., Khatun, A., Prince, M. F. R. K., Akanda, M. A. M., Rahman, M. y Islam, M. T. (2019). Chitosan biostimulant controls infection of cucumber by *Phytophthora capsici* through suppression of asexual reproduction of the pathogen. *Acta Agrobotanica*, 72(1), 1763.