

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 518**

21 Número de solicitud: 201130608

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

C12R 1/885 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

15.04.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.02.2013

Fecha de la concesión:

04.04.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

11.04.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE JAÉN (20.0%)
CAMPUS LAS LAGUNILLAS, S/N - EDIFICIO B1
23071 JAÉN (Jaén) ES;
NUTESCA, S.L. (20.0%);
FUNDACIÓN CITOLIVA (20.0%);
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (20.0%) y
UNIVERSIDAD DE SEVILLA (20.0%)**

72 Inventor/es:

**BARROSO ALBARRACÍN, Juan Bautista;
CARRERAS EGAÑA, Alfonso;
VALDERRAMA RODRÍGUEZ, Raquel;
CHAKI, Mounira;
BEGARA MORALES, Juan Carlos;
MERCADO BLANCO, Jesús;
PÉREZ ARTÉS, Encarnación;
RINCÓN ROMERO, Ana María;
CARBALLO CODÓN, Antonio;
BENÍTEZ FERNÁNDEZ, Tahía;
VALVERDE CORREDOR, Antonio;
GUEVARA PEZOA, Felipe;
RODRÍGUEZ PALERO, María Jesús;
DUEÑAS SÁNCHEZ, Rafael;
FIERRO RISCO, Jesús y
LÓPEZ GARCÍA, Antonio Alejandro**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **CEPA DE TRICHODERMA ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE
INFECCIONES PROVOCADAS POR HONGOS PERTENECIENTES AL GÉNERO
VERTICILLIUM.**

ES 2 395 518 B1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 518**

21 Número de solicitud: 201130608

57 Resumen:

Cepa de *Trichoderma* útil para el tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por hongos pertenecientes al género *Verticillium*.

La invención se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040 para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, preferiblemente por los patotipos defoliante o no defoliante de *Verticillium dahliae*, agente causante de la verticilosis del olivo. Además, la invención propone el uso de esta cepa de hongos en combinación con otros hongos del género *Trichoderma*.

ES 2 395 518 B1

DESCRIPCIÓN

**CEPA DE *TRICHODERMA* ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO Y/O
PREVENCIÓN DE INFECCIONES PROVOCADAS POR HONGOS
PERTENECIENTES AL GÉNERO *VERTICILLIUM***

5 La presente invención se encuadra en el campo de la agricultura, la microbiología y los productos fitosanitarios, y específicamente se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040 para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género
10 *Verticillium*, más preferiblemente por *Verticillium dahliae*, agente causante de la verticilosis.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 La verticilosis o marchitez vascular es una enfermedad causada por el hongo hifomiceto *Verticillium dahliae* Kleb. que puede atacar a una amplia gama de cultivos, tanto leñosos como herbáceos, entre ellos frutales, legumbres, hortícolas, forestales, ornamentales y malas hierbas. Así, los ataques de verticilosis constituyen un serio problema en diversos cultivos
20 como alcachofa, algodón, melón, tomate, patata u olivo.

Actualmente, en cultivos como el olivo, la verticilosis está considerada como uno de los problemas fitopatológicos más grave y amenazador, causante de importantes pérdidas económicas. La verticilosis del olivo
25 (VO) es una enfermedad en preocupante expansión en países donde el olivar es un cultivo relevante, afectando severamente tanto a olivares adultos como a las plantaciones jóvenes, posiblemente como consecuencia, entre otras, del establecimiento de plantaciones intensivas en suelos infestados por el patógeno y/o de la utilización de material de
30 plantación infectado. Los aislados de *Verticillium dahliae* que infectan olivos pueden ser diferenciados por su virulencia sobre la planta y clasificarse así en los patotipos defoliante (D) o no defoliante (ND) por su

capacidad o no de originar la caída generalizada de las hojas verdes de ramos infectados, respectivamente. La VO puede llegar a producir la muerte de árboles enteros o la seca de ramas ocasionando un retraso en el crecimiento y mermas de producción.

5

En general, las verticilosis son enfermedades de difícil control, a lo cual contribuyen factores tales como la capacidad del patógeno de sobrevivir prolongadamente en el suelo (hasta 15 años), la amplia gama de plantas susceptibles a la infección por éste, la dificultad de llegar hasta el hongo, ya que se encuentra en el xilema de la planta y enterrado en el suelo (a entre 10 y 30 cm de profundidad), y la ineficacia de los tratamientos químicos hasta ahora explorados para combatir al hongo durante su fase parasítica en el xilema. Como sucede con otras verticilosis de plantas leñosas, el control eficiente de la VO requiere la aplicación de una estrategia de manejo integrado de la enfermedad.

10

15

Las medidas de control de las enfermedades fúngicas del olivo han sido en muchos casos indirectas (eliminación de plantas enfermas, utilización de abonos potásicos, etc.). No obstante, desde la perspectiva de una agricultura sostenible y en una estrategia de control integrado de las enfermedades, una de las posibles medidas de control a aplicar es el uso de antagonistas microbianos con potencial como agentes de control biológico (ACBs) de la enfermedad. El control biológico de los organismos fitopatógenos constituye una alternativa más atractiva que la de los productos químicos, ya que estos ACBs son menos perjudiciales para el medio ambiente que los compuestos químicos habitualmente utilizados. Sin embargo, el uso de dichos ACBs se ha visto limitado por diferentes causas, entre ellas, una inadecuada identificación de los mismos.

20

25

30

Algunas cepas del hongo filamentoso *Trichoderma*, como por ejemplo cepas pertenecientes a la especie *Trichoderma harzianum*, han sido utilizadas como agentes de control biológico contra hongos patógenos de

plantas, debido a su capacidad protectora tanto contra hongos del suelo que infectan las raíces como contra los que producen enfermedades en las partes aéreas. Algunas de estas cepas tienen también un efecto fertilizante sobre las plantas, estimulando su vigor, crecimiento y mecanismos de defensa.

Las cepas de *Trichoderma* emplean distintos mecanismos para atacar a los hongos. Se han descrito relaciones de micoparasitismo entre *Trichoderma harzianum* y *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* o *Pythium*, donde las enzimas líticas juegan un papel primordial, y relaciones de competición entre *Trichoderma harzianum* y *Botrytis cinerea* (en vid) o *Fusarium* (en algodón). Así, cepas de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens* y *Trichoderma viride* (Hermosa *et al.*, 2000, *Applied and Environmental Microbiology*, 66:5, pp. 1890–1898), y otras de *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma inhamatum* (ES2200602 A1), han sido utilizadas en combinación como ACBs en composiciones contra diferentes hongos patógenos de plantas. Un ejemplo de composición sinérgica de este tipo es aquella que comprende diferentes cepas de *Trichoderma harzianum* (aquellas con número de acceso en la colección NRRL 30595, 30596 y 30597) que posee capacidad controladora de hongos fitopatógenos, es tolerante al estrés abiótico, estimula el crecimiento de la planta así como su contenido en fenoles e induce resistencia sistémica a enfermedades causadas por organismos fitopatógenos (WO2007110686 A2).

En el caso del patógeno *Verticillium dahliae*, se han caracterizado una amplia gama de antagonistas del mismo, entre los que se encuentran diferentes cepas de *Trichoderma* (Berg *et al.*, 2005, *Applied and Environmental Microbiology*, 71:8, pp. 4203–4213). De hecho, uno de los métodos propuestos para el control biológico de este hongo fitopatógeno en el olivo se basa en la aplicación de esporas de *Trichoderma*

harzianum, lo que además favorece la biofertilización (WO2009083819 A1).

5 Los criterios a utilizar para la elección de las cepas de *Trichoderma* adecuadas para su empleo como ACBs presentan como principales características: 1) producción de enzimas líticos y 2) buen desarrollo en condiciones de competición. Esto último también depende de: 3) las condiciones de producción y preparación del inóculo y de 4) factores ambientales, incluyendo la presencia de fungicidas y/o pesticidas. En este
10 sentido, se ha desarrollado una cepa mutante de *Trichoderma harzianum* CECT 2413, la cepa *Trichoderma harzianum* PF1, que posee una capacidad de producción de enzimas líticos superior a la de la cepa salvaje, y se ha ensayado su efecto en el crecimiento de agentes fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* o *Botrytis cinerea*, demostrándose
15 que efectivamente su actividad antifúngica se encuentra incrementada con respecto a la de la cepa de la que procede (Rey *et al.*, 2001, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, pp. 604–608).

20 En cuanto a la mejora de la capacidad de competición de las cepas en el entorno, éste es un proceso complejo pero en algunas aproximaciones experimentales se ha intentado la obtención de cepas mejoradas, más adaptables al entorno (aumento de los mecanismos de resistencia a la sequedad, a la presencia de metales, a la producción de enzimas o sustancias tóxicas por parte de los patógenos, capacidad de colonizar
25 suelos con pHs extremos, etc.). Sobre todo, serían de interés cepas resistentes a fungicidas, lo que permitiría una mejor adaptación a un entorno tratado con estos compuestos y la posibilidad de un tratamiento integrado que combine pequeñas dosis de fungicidas a las que los patógenos sean sensibles combinadas con las cepas de *Trichoderma*
30 resistentes. El efecto combinado permitiría un mejor control y una mayor protección que el simple tratamiento químico o biológico. Por otro lado, la

competencia de las cepas de *Trichoderma* en el suelo podría optimizarse aplicando de forma óptima el agente de biocontrol.

5 En resumen, sería deseable disponer de agentes de control biológico que proporcionasen un efecto paliativo mejorado frente a la infección por los patotipos ND y D del hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae* en variedades de plantas susceptibles de ser infectadas por el mismo, como por ejemplo, el olivo.

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención propone el uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040 para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, más preferiblemente por los patotipos defoliante o no defoliante de *Verticillium dahliae*, agente causante de la verticilosis.

Los ejemplos de la presente invención demuestran que la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040 presenta una capacidad de inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae* mejorada con respecto a otras cepas de su mismo género, y esta inhibición se observa tanto en aislados del patógeno con capacidad defoliante como no defoliante, y tanto sensibles como resistentes a hongos del género *Trichoderma* (Figuras 2 y 3). Por tanto, la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040 posee un elevado valor paliativo y preventivo frente a la infección de plantas y/o suelos provocada por hongos fitopatógenos del género *Verticillium*, más preferiblemente por *Verticillium dahliae*, siendo aplicable tanto en condiciones de vivero como de campo.

30 Por todo ello, un aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y/o de los productos de su metabolismo, para la prevención y/o tratamiento de infecciones

provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*.

5 La cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040 es conocida en el estado de la técnica y por tanto se encuentra accesible para un experto en la materia. Dicha cepa es identificable tanto por sus características morfológicas, las cuales se pueden encontrar descritas en bases de datos para *Trichoderma* tales como por ejemplo, pero sin limitarnos, la recogida en <http://www.isth.info>, como por ciertos marcadores moleculares, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, la secuencia de los espaciadores internos de los genes de rRNA, ITS1 e ITS2.

15 Tal y como se utiliza en la presente invención, el término “productos del metabolismo” o “metabolitos” se refiere a cualquier molécula excretada por la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040, preferiblemente cuando dicha cepa se encuentra creciendo en presencia de medio de cultivo PDA (Agar Patata-Dextrosa). Ejemplos de estos metabolitos son, aunque sin limitarnos, aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, ácidos orgánicos, alcoholes, como los polioles, azúcares, como los polisacáridos, 20 antibióticos, enzimas, tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, enzimas hidrolíticas de pared celular, etc.

25 Una vez excretados, los productos del metabolismo de la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040 pueden ser aislados y aplicados, solos o en combinación con dicha cepa, directamente a la planta, tanto a las raíces como a la parte aérea, al material vegetal, incluyendo pero sin limitarnos semillas, hojas o frutos, o al suelo. Cuando los productos del metabolismo son administrados en combinación con la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040, el modo de administración puede ser simultáneo o 30 secuencial. O bien, la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040 puede ser administrada sola tanto a las raíces como a la parte aérea de la planta, al material vegetal, incluyendo pero sin limitarnos semillas, hojas o frutos, o

al suelo, de manera que produzca dichos productos del metabolismo *in situ*.

5 La cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y/o los productos de su metabolismo, pueden administrarse a, por ejemplo pero sin limitarnos, una planta, tanto a las raíces como a la parte aérea, al material vegetal, incluyendo pero sin limitarnos semillas, hojas o frutos, o al suelo, en una cantidad efectiva para el tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género
10 *Verticillium*. En el sentido utilizado en esta descripción, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad suficiente de la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y/o de los productos de su metabolismo, que permita obtener los resultados deseados. Dicha cantidad efectiva puede administrarse en una sola vez o en varias
15 administraciones. En términos de tratamiento y prevención, una "cantidad suficiente" es la cantidad suficiente para evitar, paliar, mejorar, estabilizar, revertir, retardar o retrasar los efectos derivados de las infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*. Preferiblemente, la cantidad efectiva a administrar de la cepa
20 *Trichoderma atroviride* IMI 206040 es de entre 10^4 y 10^6 esporas/ml de agua de riego, y más preferiblemente de 10^5 esporas/ml (a partir de $1,4 \times 10^{11}$ unidades formadoras de colonias/g).

El modo de administración de la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040,
25 y/o de los productos de su metabolismo, puede realizarse, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante el agua de riego, pulverización, rociado, revestimiento, fumigación, impregnación, mezcla con el sustrato, inmersión de la raíz de la planta en una solución que comprenda la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040, o esporas de la misma
30 pregerminadas, y/o los productos de su metabolismo.

- Los “hongos fitopatógenos” son aquellos organismos pertenecientes al reino Fungi capaces de provocar infecciones, y en ocasiones enfermedades, en las plantas por medio de alteraciones en su metabolismo, mediante por ejemplo, aunque sin limitarnos, la secreción de enzimas, toxinas, fitoreguladores y otras sustancias y, además, mediante la absorción de nutrientes de la planta para su propio crecimiento. Los hongos fitopatógenos de la presente invención son aquellos pertenecientes al género *Verticillium*.
- 5
- 10 El género de hongos *Verticillium* pertenece a la división o filo *Ascomycota*, familia *Plectosphaerellaceae* e incluye diversos grupos que comprenden parásitos y saprófitos de plantas, insectos, nemátodos, huevos de moluscos y otros hongos, por lo que el género tiene un amplio rango de grupos taxonómicos, conteniendo unas 51 especies, entre las que se encuentran, aunque sin limitarnos, *Verticillium dahliae*, *Verticillium alboatrum*, *Verticillium nubilum*, *Verticillium nigrescens* o *Verticillium tricorpus*. Las especies de este género son las causantes de las enfermedades conocidas como verticilosis.
- 15
- 20 La presencia de hongos fitopatógenos del género *Verticillium* en las plantas o en el suelo puede detectarse mediante técnicas de biología molecular conocidas en el estado de la técnica para llevar a cabo dicha identificación, como por ejemplo, amplificando mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) o Q-PCR, una región del genoma del hongo fitopatógeno presente en una muestra biológica aislada del suelo o de la planta y comparando el producto de amplificación obtenido con las secuencias génicas disponibles en bases de datos tales como, por ejemplo, pero sin limitarnos, GenBank, específicas de organismos del género *Verticillium*, para determinar el tipo de patógeno presente en la muestra. La presencia de hongos fitopatógenos del género *Verticillium* en las plantas o en el suelo también
- 25
- 30

podría llevarse a cabo mediante técnicas inmunohistoquímicas, como por ejemplo, pero sin limitarnos, ELISA; o bien mediante el crecimiento *in vitro* de los organismos contenidos en la muestra biológica aislada de suelo o de la planta en medios de cultivo selectivos específicos de patógenos pertenecientes al género *Verticillium*. En este sentido, el método más sencillo para identificar patógenos de este género mediante el cultivo en un medio selectivo es, por ejemplo, aunque sin limitarnos, el cultivo en medio PDA (Agar Patata-Dextrosa) a temperatura ambiente, donde las colonias crecen de color blanco y el color del fondo de las placas es entre incoloro y amarillento. Algunos cultivos pueden tener un perfil bajo con bordes redondeados y formando curvas. Las especies *Verticillium alboatrum*, *Verticillium dahliae* y *Verticillium tricorpus* presentan colonias postradas y de un color amarillo anaranjado en medio de cultivo PDA, la especie *Verticillium nubilium* forma clamidosporas globosas y *Verticillium nigrescens* forma clamidosporas abundantes.

En una realización preferida, el hongo fitopatógeno es *Verticillium dahliae*. La especie *Verticillium dahliae* se caracteriza por la producción de conidióforos con fiáldas dispuestas en verticilo y la formación de numerosos microesclerocios, estructuras de resistencia. El hongo se puede encontrar en el suelo en forma de micelio y conidios, o en forma de microesclerocios. Algunos cultivos infectados por este patógeno pueden ser asintomáticos, pero en general se distinguen dos tipos de síndromes derivados de esta infección que origina la enfermedad denominada “verticilosis”: apoplejía y decaimiento lento. Los síntomas iniciales del primer síndrome consisten en la pérdida de coloración de las hojas, más tarde se produce una seca rápida de brotes y ramas que suele comenzar desde la punta y que puede ocasionar la muerte del árbol. La corteza de las ramas afectadas puede tomar color morado o púrpura y a veces también se observa una coloración marrón en los tejidos del xilema. Los síntomas más típicos del decaimiento lento son la necrosis y momificado de las inflorescencias mientras que las hojas generalmente se

desprenden, excepto las del extremo. En el contexto de la presente invención, se incluyen dentro del término "*Verticillium dahliae*" tanto su patotipo defoliante (D) como su patotipo no defoliante (ND). El patotipo D de *Verticillium dahliae* se caracteriza por provocar la caída generalizada de las hojas verdes de ramos infectados, al contrario que el patotipo ND. El diagnóstico de la infección por uno u otro patotipo de *Verticillium dahliae* podría llevarse a cabo mediante técnicas de visualización fenotípica en base a la característica sintomática anteriormente mencionada, o bien mediante técnicas moleculares de caracterización de ambos patotipos, como por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante PCR (Mercado-Blanco *et al.*, 2002, *Olivae: revista oficial del Consejo Oleícola Internacional*, 94:41-46).

Ejemplos de plantas susceptibles a la infección por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, y preferiblemente por *Verticillium dahliae*, son, pero sin limitarnos, alcachofa, algodón, melón, tomate, patata u olivo. Por tanto, en otra realización preferida, la planta afectada por el hongo fitopatógeno se selecciona de la lista que comprende: alcachofa, algodón, melón, tomate, patata u olivo. En una realización más preferida, la planta es el olivo. Cuando *Verticillium dahliae* infecta al olivo provoca lo que se denomina "verticilosis del olivo o VO". La presente invención se refiere tanto a las variedades de olivo muy susceptibles al patotipo D, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, *Picual* o *Arbequina*, como a las variedades susceptibles al patotipo ND.

El término "tratamiento", tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos provocados como consecuencia de una infección causada por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, preferiblemente por *Verticillium dahliae*, en una planta, en un cultivo o en un suelo. Este término incluye:

- (i) inhibir la infección, es decir, detener su desarrollo;

- (ii) aliviar los efectos provocados por la infección, es decir, causar su regresión;
- (iii) estabilizar los efectos provocados por la infección.

5 El término “prevención”, tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de daños cuya causa sean las infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, preferiblemente por *Verticillium dahliae*; es decir, evitar que se produzca la infección en una planta, en un cultivo o en un suelo, en particular, cuando dicha planta, cultivo o suelo tienen predisposición a la
10 infección pero aún no se ha diagnosticado que la tengan.

Se entiende por “infección” la colonización de un organismo huésped, por ejemplo, aunque sin limitarnos, una planta, por agentes patógenos, los
15 cuales en el contexto de la presente invención consisten en hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, que invaden el organismo y se multiplican en él, produciendo sustancias tóxicas. El organismo colonizador es perjudicial para el funcionamiento normal y la supervivencia del huésped, por lo que se califica al agente como patógeno o, en el contexto de la presente invención, como fitopatógeno.
20 Dentro del término “infección” se incluyen tanto las infecciones localizadas que afectan a una única área del organismo huésped, como las infecciones generalizadas que afectan a todo el organismo; y tanto las infecciones sintomáticas como asintomáticas. Asimismo, dentro de dicho
25 término se incluyen también infecciones de suelos provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, preferiblemente por *Verticillium dahliae*.

En los ejemplos de la presente invención se demuestra la eficacia, no solo
30 de la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040 y de sus productos del metabolismo, sino también de otras cepas de *Trichoderma*, en concreto de *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT

20756, *Trichoderma harzianum* PF1 y *Trichoderma harzianum* CECT 2413, y de los productos del metabolismo de éstas, para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, como por ejemplo, pero sin limitarnos, de *Verticillium dahliae*. Por ello, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y/o de los productos de su metabolismo, en combinación con al menos una cepa de *Trichoderma* seleccionada de la lista que comprende: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 20756, *Trichoderma harzianum* PF1 o *Trichoderma harzianum* CECT 2413, para la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*.

En los ejemplos de la presente invención también se demuestra la eficacia de la combinación de las cinco cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 2413, *Trichoderma harzianum* CECT 20756 y *Trichoderma harzianum* PF1, para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, de *Verticillium dahliae*. Por ello, una realización más preferida se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y/o de los productos de su metabolismo, en combinación con las cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 2413, *Trichoderma harzianum* CECT 20756 y *Trichoderma harzianum* PF1, para la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*.

Las cepas *Trichoderma harzianum* PF1, *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y *Trichoderma harzianum* CECT 20756 pueden administrarse a una planta, tanto a las raíces como a la parte aérea, al material vegetal,

incluyendo pero sin limitarnos semillas, hojas o frutos, o al suelo, para el tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, preferiblemente por *Verticillium dahliae*, de manera simultánea o secuencial. Además, dichas cepas pueden administrarse en combinación con elementos necesarios para su crecimiento y desarrollo, como por ejemplo aunque sin limitarnos, fuentes de carbono, sales minerales y/o nutrientes orgánicos e inorgánicos.

En una realización aun más preferida las cepas de *Trichoderma harzianum* PF1, *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y/o *Trichoderma harzianum* CECT 20756 se encuentran en estado esporulado.

Se entiende por “estado esporulado” el estadio del hongo en el que éste se encuentra en forma de spora. El término “spora” se refiere a la célula reproductora producida en los esporangios de los hongos, ya sea asexualmente o como resultado de un proceso de reproducción sexual, generalmente haploide y unicelular, que al mismo tiempo permite la dispersión y la supervivencia por largo tiempo (dormancia) en condiciones adversas. La spora produce un nuevo organismo al dividirse por mitosis sin fusión con otra célula, produciendo un gametofito pluricelular. Cuando la spora germina surge de ella una primera hifa, por cuya extensión y ramificación se va constituyendo un micelio.

Los ejemplos de la presente invención demuestran que cuando se inoculan hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, *Verticillium dahliae*, en un medio de cultivo donde previamente ha crecido la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040 y excretado toda clase de metabolitos antes de ser retirada de dicho medio, existe inhibición del crecimiento del hongo fitopatógeno.

También demuestran dicha inhibición cuando el patógeno se inocula en un medio de cultivo donde previamente han crecido las cepas de *Trichoderma harzianum* PF1, *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y/o *Trichoderma harzianum* CECT 20756 y excretado toda clase de metabolitos antes de ser retiradas de dicho medio. Así, los inventores ponen de manifiesto que tanto el micelio de la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040 y de estas otras cepas de *Trichoderma*, como los metabolitos excretados al medio por las mismas, son capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, *Verticillium dahliae*. Por ello, otra realización preferida se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y/o de los productos de su metabolismo, en combinación con productos del metabolismo de al menos una cepa de *Trichoderma* seleccionada de la lista que comprende: *Trichoderma harzianum* PF1, *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 o *Trichoderma harzianum* CECT 20756, para la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*. Una realización más preferida se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y/o de los productos de su metabolismo, en combinación con productos del metabolismo de las cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma harzianum* PF1, *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y *Trichoderma harzianum* CECT 20756, para la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*.

Las cepas *Trichoderma harzianum* PF1, *Trichoderma harzianum* CECT 2413, y los mutantes *Trichoderma atroviride* CECT 20755 y *Trichoderma harzianum* CECT 20756, se encuentran accesibles para un experto en la materia. *Trichoderma harzianum* PF1 es una cepa mutante derivada de *Trichoderma harzianum* CECT 2413 inducida con nitrosoguanidina,

caracterizada por su capacidad superexcretora de enzimas hidrolíticas (glucanasas, proteasas y/o quitinasas). Esta cepa comparte las características morfológicas de la cepa de la que procede. La cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413 es identificable tanto por sus características morfológicas, las cuales se pueden encontrar descritas en bases de datos para *Trichoderma* tales como por ejemplo, pero sin limitarnos, la recogida en <http://www.isth.info>, como por ciertos marcadores moleculares, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, la secuencia de los espaciadores internos de los genes de rRNA, ITS1 e ITS2. El mutante derivado de *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma atroviride* CECT 20755 o RCU1, y el mutante derivado de *Trichoderma harzianum* CECT 2413, *Trichoderma harzianum* CECT 20756 o RCU2, ambos resistentes a cobre, comparten las características morfológicas de las cepas de las que proceden.

Las cepas *Trichoderma atroviride* CECT 20755 o RCU1 y *Trichoderma harzianum* CECT 20756 o RCU2 son resistentes a cobre, metal utilizado como fungicida principalmente en el sector del olivar. Por tanto, esta capacidad permite el uso de las mismas de manera combinada con otros agentes antifúngicos en un método de tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*. Por ello, otra realización preferida se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y/o de los productos de su metabolismo, en combinación con otros agentes antifúngicos, para la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*. Cuando la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y/o los productos de su metabolismo, se administra en combinación con una de las cepas RCU1 o RCU2, o con las dos, puede ser utilizada en combinación con otros agentes antifúngicos de naturaleza química.

El término "agente antifúngico" se refiere a aquellas sustancias, tanto de naturaleza biológica como química, que se emplean para inhibir el crecimiento (fungistáticos) o para matar (fungicidas) a los hongos capaces de provocar infecciones en las plantas y/o suelos, preferiblemente a *Verticillium*, más preferiblemente a *Verticillium dahliae*. El término se refiere tanto a agentes antifúngicos protectores o de contacto, que se aplican antes de que se produzca la infección, como a agentes antifúngicos erradicadores o sistemáticos, que se aplican una vez producida la infección, así como a agentes antifúngicos de uso en revestimientos de semillas, de uso para desinfección del suelo, para su aplicación sobre las plantas, etc. Un ejemplo de agente antifúngico de naturaleza biológica son los microorganismos que actúan como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos, como por ejemplo, pero sin limitarnos, hongos del género *Trichoderma* distintos a los descritos en la presente invención, hongos pertenecientes a otros géneros o bacterias, y sus mezclas, siempre y cuando éstos no sean incompatibles con las cepas *Trichoderma harzianum* PF1, *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y *Trichoderma harzianum* CECT 20756. Algunos tipos de "agentes antifúngicos de naturaleza química" son, aunque sin limitarnos, aquellos compuestos por cloruro de cobre, oxiclорuro de cobre, óxido cúprico, "caldo bordelés", quinolinolato de cobre-8, carbonato de cobre básico, naftenato de cobre, sulfato de cobre, cromato de cobre u oleato de cobre.

Por otro lado, los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* con frecuencia actúan como agentes fertilizantes. Por esta razón, y porque además la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040 posee capacidad para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, los cuales pueden comprometer la viabilidad y el desarrollo de la planta a la que infectan o la idoneidad del suelo de cultivo, otra aplicación de la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040 y/o de los productos de su metabolismo, es su uso como fertilizante, preferiblemente

en plantas de olivo. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y/o de los productos de su metabolismo, en combinación con al menos una cepa de *Trichoderma* seleccionada de la lista que comprende: *Trichoderma harzianum* PF1, *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 o *Trichoderma harzianum* CECT 20756, como fertilizante. Una realización más preferida se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y/o de los productos de su metabolismo, en combinación con las cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma harzianum* PF1, *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y *Trichoderma harzianum* CECT 20756, como fertilizante.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y/o de los productos de su metabolismo, en combinación con productos del metabolismo de al menos una cepa de *Trichoderma* seleccionada de la lista que comprende: *Trichoderma harzianum* PF1, *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 o *Trichoderma harzianum* CECT 20756, como fertilizante. Una realización más preferida se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y/o de los productos de su metabolismo, en combinación con productos del metabolismo de las cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma harzianum* PF1, *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y *Trichoderma harzianum* CECT 20756, como fertilizante.

El término "fertilizante" se refiere a cualquier sustancia o mezcla de sustancias químicas y/o biológicas, de origen natural o sintético, utilizada para suministrar los elementos inorgánicos u orgánicos al suelo con el fin de que la planta los absorba y favorecer así su crecimiento o vigor.

El término "género" se refiere a la categoría de la clasificación biológica (categoría taxonómica) que se ubica entre la familia y la especie y que comprende una o más especies morfológicamente similares relacionadas filogenéticamente. Por "categoría taxonómica" se entiende el nivel de jerarquía utilizado para la clasificación de los organismos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Muestra los resultados de los ensayos de enfrentamiento directo entre la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040, o una combinación de *Trichoderma atroviride* IMI 206040 y *Trichoderma harzianum* CECT 2413, y distintos aislados de *Verticillium dahliae*. Placas de Petri conteniendo PDA a distintos tiempos de incubación (3 y 15 días) a 22 °C en las que se encuentran creciendo: (A) diferentes aislados de *V. dahliae* (control), (B) diferentes aislados de *V. dahliae* en un extremo y *Trichoderma atroviride* IMI 206040 en otro extremo, (C) diferentes aislados de *V. dahliae* en un extremo y una combinación de las cepas *Trichoderma atroviride* IMI 206040 y *Trichoderma harzianum* CECT 2413 en otro extremo.

Fig. 2. Muestra el crecimiento de distintos aislados de *Verticillium dahliae* durante los ensayos de enfrentamiento directo con las cepas *Trichoderma harzianum* CECT 2413 (2413), *Trichoderma viride* CECT 2423 (2423) o *Trichoderma atroviride* IMI 206040 (IMI), o

combinaciones de las mismas, a los 3 (blanco), 6 (gris) y 15 (negro) días de incubación. (A) Aislado de *V. dahliae* 1A-2. (B) Aislado de *V. dahliae* 1A-3. (C) Aislado de *V. dahliae* 1A-4. (D) Aislado de *V. dahliae* 2A-12. (E) Aislado de *V. dahliae* 2A-16. (F) Aislado de *V. dahliae* 2A-17.
 5 (G) Aislado de *V. dahliae* 4B-31. (H) Aislado de *V. dahliae* 4B-34. (I) Aislado de *V. dahliae* 4B-35.

Fig. 3. Muestra los resultados de los ensayos de enfrentamiento directo entre las cepas de *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma atroviride* RCU1, *Trichoderma harzianum* CECT 2413, *Trichoderma harzianum* RCU2 y/o *Trichoderma harzianum* PF1, y dos aislados de *Verticillium dahliae*. (A) Placas de Petri en las que se encuentran creciendo en un extremo las cepas *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma atroviride* RCU1 o *Trichoderma harzianum* CECT 2413, y en el extremo opuesto los aislados de *Verticillium dahliae* 1A-2 ó 2A-12. (B) Placas de Petri en las que se encuentran creciendo en un extremo las cepas *Trichoderma harzianum* RCU2, *Trichoderma harzianum* PF1 o una combinación de las cinco cepas *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma atroviride* RCU1, *Trichoderma harzianum* CECT 2413, *Trichoderma harzianum* RCU2 y *Trichoderma harzianum* PF1, formada por 1/5 de cada una (formulación), y en el extremo opuesto los aislados de *Verticillium dahliae* 1A-2 ó 2A-12. Control: cajas de Petri en las que únicamente se inoculó *Verticillium dahliae* 1A-2 ó 2A-12. Las imágenes se tomaron tras 18 días de crecimiento.

25

Fig. 4. Muestra la inhibición del crecimiento (%) en cultivos de diez días de los distintos aislados de *Verticillium* (1A2, 1A3, 1A4, 2A12, 2A16, 2A17, 4B31, 4B34, 4B35) por los metabolitos de las cepas *T. harzianum* CECT 2413 (2413), *T. atroviride* IMI 206040 (IMI) y *T. viride* CECT 2423 (VIRIDE) o por los metabolitos de las combinaciones de estas cepas entre sí.

30

Fig. 5. Muestra el crecimiento de dos aislados de *Verticillium dahliae*, 1A-2 (A) y 2A-12 (B), en medios donde habían crecido previamente las cepas de *Trichoderma*, *Trichoderma atroviride* IMI 206040 (*T. atroviride*), *Trichoderma atroviride* RCU1, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 (*T. harzianum*), *Trichoderma harzianum* RCU2 o *Trichoderma harzianum* PF1, o una combinación de estas cinco cepas formada por 1/5 de cada una (formulación). La figura muestra el crecimiento de dos aislados del patógeno en presencia de metabolitos excretados por las diferentes cepas de *Trichoderma*. Control: crecimiento de *Verticillium dahliae* 1A-2 (A) ó 2A-12 (B) en cajas de Petri en las que no había crecido ninguna cepa de *Trichoderma* previamente.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040 en la inhibición del crecimiento de aislados representativos de los patotipos defoliante y no defoliante del hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae*. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

25

EJEMPLO 1. Ensayos de antagonismo *in vitro* de distintas cepas de *Trichoderma* y aislados de *Verticillium dahliae*.

Se procedió a la realización de un conjunto de ensayos de antagonismo *in vitro* de distintas cepas de *Trichoderma*, o combinaciones de cepas, con el objeto de determinar su capacidad antifúngica frente a aislados de *Verticillium dahliae* suministrados por el Instituto de Agricultura Sostenible

30

(IAS-CSIC-Córdoba). Así, se realizaron dos tipos de ensayos de antagonismo: uno de confrontación directa y otro de capacidad de crecimiento de distintos aislados de *Verticillium dahliae* en un medio donde *Trichoderma* había crecido previamente y excretado toda clase de metabolitos (incluidos antibióticos y enzimas hidrolíticas de pared celular). Como se explicará más adelante, los ensayos incluyeron enfrentamiento directo en medio sólido y ensayos con celofanes para ver el efecto de las sustancias secretadas por *Trichoderma*, siguiendo protocolos habituales en el laboratorio para ensayos con *Rhizoctonia* y *Fusarium*.

10

Las cepas de *Trichoderma* utilizadas en los ensayos fueron: *Trichoderma harzianum* CECT 2413, *Trichoderma viride* CECT 2423 y *Trichoderma atroviride* IMI 206040, así como las siguientes combinaciones de las mismas: *T. atroviride* IMI 206040 + *T. viride* CECT 2423, *T. harzianum* CECT 2413 + *T. atroviride* IMI 206040, y *T. harzianum* CECT 2413 + *T. viride* CECT 2423, y en combinación con los aislados de *Verticillium* 1A-2, 1A-3, 1A-4, caracterizados como patotipos defoliantes, y 2A-12, 2A-16, 2A-17, 4B-31, 4B-34, 4B-35, con capacidad no defoliante.

15

20

Además, se procedió al desarrollo y caracterización de mutantes espontáneos resistentes a cobre (a 4 mM de Cu_2SO_4) derivados de *Trichoderma harzianum* y de *Trichoderma atroviride*, con el objeto de disponer así de cepas resistentes a los contaminantes metálicos utilizados como antifúngicos, entre los cuales el cobre es ampliamente utilizado en el sector del olivar. Concretamente, dichas cepas mutantes son las que a continuación se detallan y que en la actualidad se encuentran depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT):

25

30

-*Trichoderma atroviride* RCU1 (número de depósito en la CECT 20755), derivado de *Trichoderma atroviride* IMI 206040.

-*Trichoderma harzianum* RCU2 (número de depósito en la CECT 20756), derivado de *Trichoderma harzianum* CECT 2413.

Además, en los ensayos de la presente invención se incluyó también la cepa *Trichoderma harzianum* PF1, mutante inducido con nitrosoguanidina derivado de *Trichoderma harzianum* CECT 2413 con una elevada capacidad antifúngica y que se caracteriza como superexcretor de enzimas hidrolíticas (glucanasas, proteasas y quitinasas).

Se han realizado también ensayos para comprobar la eficacia *in vitro* de una composición que comprende cinco cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma atroviride* RCU1, *Trichoderma harzianum* CECT 2413, *Trichoderma harzianum* RCU2 y *Trichoderma harzianum* PF1.

En los experimentos se pretendía, por tanto, establecer la capacidad de distintas cepas del hongo *Trichoderma* de controlar a aislados de *Verticillium dahliae* causantes de la verticilosis en el olivo.

1.1. Ensayos de confrontación directa de distintas cepas de *Trichoderma* y aislados de *Verticillium dahliae*.

Los ensayos de confrontación directa consistieron en inocular una porción de micelio de los distintos aislados de *V. dahliae* a ensayar en un extremo de cajas de Petri conteniendo medio de cultivo nutritivo PDA (puré de patatas 2%, glucosa 2%, agar 2%). Las cajas se incubaron a 22 °C durante 4 días para permitir el crecimiento del patógeno y posteriormente se inocularon, en el extremo opuesto de las cajas, 20 µl de esporas de las distintas cepas de *Trichoderma* a una concentración de 10⁵ esporas/ml. Las cajas continuaron incubándose a 22 °C durante 18 días. Como control se inocularon cajas con medio nutritivo PDA con los distintos aislados de *V. dahliae* en las que no se inoculó *Trichoderma*.

Al cabo del tiempo, los hongos entraron en contacto y podían darse dos situaciones distintas: que ambos parasen su crecimiento en la zona de

contacto o que uno de ellos provocase una lisis del micelio del otro y acabase creciendo por encima de éste. De hecho, el efecto antagonista se comprobó viendo el sobrecrecimiento de *Trichoderma* y la posible muerte del patógeno al microscopio y por siembra en medio selectivo para el patógeno (crecimiento en presencia de tóxicos en el que *Trichoderma* no podía crecer pero al que el patógeno era resistente).

En la figura 1 se aprecian los resultados de los enfrentamientos de la cepa *T. atroviride* IMI 206040 (Fig. 1B), o de la combinación de cepas *T. atroviride* IMI 206040 y *T. harzianum* CECT 2413 (Fig. 1C), con diferentes aislados de *Verticillium*. Así, se observó que la cepa *T. atroviride* IMI 206040 y la combinación de cepas *T. atroviride* IMI 206040 y *T. harzianum* CECT 2413 sobrecrecían al patógeno, reduciendo el área ocupada por el mismo.

Para analizar cuantitativamente los resultados obtenidos se midió el área de crecimiento de las distintas cepas de *Verticillium* en los diferentes ensayos de enfrentamiento con *Trichoderma*. Los resultados obtenidos se representan en la figura 2 A-I a diferentes tiempos de incubación (3, 6, y 15 días). Se observó que en la mayoría de los casos las cepas de *Trichoderma* empleadas sobrecrecían al patógeno, aunque en algunos casos las cepas sólo consiguieron parar su crecimiento (véase el caso de *T. harzianum* CECT 2413 contra *V. dahliae* 1A-3 y 1A-4). La cepa más eficiente fue *T. atroviride* IMI 206040, capaz de reducir el crecimiento del patógeno en el 100% de los casos, y sólo contra la cepa de *Verticillium* 2A-17 una combinación de *T. atroviride* IMI 206040 con *T. viride* CECT 2423 mejoró la capacidad antagonista de IMI de manera individual (Fig. 2).

Por tanto, el análisis de estos resultados mostró un efecto inhibitor del crecimiento, tanto de aislados de *Verticillium* defoliantes como no defoliantes, fundamentalmente en el caso de *Trichoderma atroviride* IMI

206040, sola o en combinación con *T. viride* CECT 2423 y *T. harzianum* CECT 2413, y con una clara tendencia que se hizo patente tras 15 días de incubación, anulando por completo el crecimiento del patógeno *Verticillium*.

5

En la figura 3 se aprecian los resultados de los enfrentamientos de las cepas *T. atroviride* IMI 206040, *T. atroviride* RCU1, *T. harzianum* CECT 2413, *T. harzianum* RCU2, *T. harzianum* PF1, o una combinación de estas cinco cepas (formulación), con los aislados de *Verticillium* 1A-2, representante del patotipo defoliante, o 2A-12, aislado más sensible a cepas del género *Trichoderma* representante del patotipo no defoliante. Como se puede observar, la composición de estas cinco cepas de *Trichoderma* (formulación) fue más eficaz frente a los dos aislados de *Verticillium dahliae* ensayados que la mayoría de las cepas que la componen por separado, salvo en el caso de *Trichoderma atroviride* IMI 15 206040 y de su cepa derivada, RCU1, que presentan una capacidad similar.

1.2. Ensayos de capacidad de crecimiento de distintos aislados de
20 *Verticillium dahliae* en presencia de metabolitos excretados por
Trichoderma.

Se realizaron ensayos de capacidad de crecimiento del patógeno en presencia de metabolitos excretados por *Trichoderma* mediante el cultivo de las cepas de *Trichoderma* sobre un disco de celofán permeable a 25 metabolitos extracelulares (hidrolasas, antibióticos, etc.) colocado a su vez sobre el medio de cultivo PDA de una caja de Petri, a 22 °C. A los cuatro días de crecimiento, se retiró el celofán y con él el micelio desarrollado y un trozo de micelio del patógeno se colocó en el centro de las cajas. Para analizar cuantitativamente los resultados obtenidos en 30 este ensayo con celofanes, a los diez días se midió el área de crecimiento de los distintos aislados de *V. dahliae* y se comparó el diámetro de

crecimiento del patógeno en cajas control con el crecimiento en cajas donde *Trichoderma* había crecido sobre un celofán y que previamente había sido retirado antes de inocular el patógeno.

5 En la figura 4 se representan los resultados de inhibición de crecimiento obtenidos para aislados del patógeno cultivados en medios conteniendo metabolitos de las cepas *T. harzianum* CECT 2413, *T. viride* CECT 2423, *T. atroviride* IMI 206040, o metabolitos secretados por combinaciones de estas cepas. Como puede observarse en esta figura todos los aislados de
 10 *Verticillium* ensayados presentaron una alta sensibilidad a los metabolitos producidos por estas tres cepas de *Trichoderma*, siendo inhibido su crecimiento en alrededor de un 90%. Aunque las diferencias entre cepas no fueron muy elevadas, parece que la combinación *T. harzianum* CECT 2413/*T. atroviride* IMI 206040 posee un ligero incremento en la capacidad
 15 de inhibir el crecimiento de todos los aislados del patógeno en general.

En la figura 5 se representan los resultados obtenidos con los metabolitos de las cepas *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma atroviride* CECT 20755 o RCU1, *Trichoderma harzianum* CECT 20756 o RCU2,
 20 *Trichoderma harzianum* PF1 o *Trichoderma harzianum* CECT 2413, o con los metabolitos secretados por una combinación de estas cinco cepas (formulación), sobre el crecimiento de un aislado del patógeno sensible a cepas de *Trichoderma* (2A-12, patotipo no defoliante) o de un aislado más resistente (1A-2, patotipo defoliante), a diferentes tiempos de incubación
 25 (días). En este sentido, en ensayos para determinar la capacidad de inhibir el crecimiento de *V. dahliae* que tienen los metabolitos excretados por estas cepas de *Trichoderma*, se observaron resultados similares a los anteriores aunque diferentes según la cepa del patógeno. La formulación (combinación de estas cinco cepas) fue tan eficaz como las cepas que la
 30 componían contra el aislado más sensible del patógeno (2A-12, patotipo no defoliante) pero fue intermedia contra el aislado más resistente (1A-2, patotipo defoliante). Esto último puede deberse a un efecto de dilución de

los metabolitos que intervienen en esta interacción debido a que en la formulación las cepas iban en una proporción 1/5 cada una.

5 En resumen, estos resultados determinan la capacidad específica de las cepas de *Trichoderma* propuestas en la presente invención de controlar e impedir *in vitro* el desarrollo del patógeno *Verticillium dahliae*.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040 y/o de los productos de su metabolismo para la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*.
- 10 2. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según la reivindicación 1 donde el hongo fitopatógeno es *Verticillium dahliae*.
- 15 3. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde la planta afectada por el hongo fitopatógeno se selecciona de la lista que comprende: alcachofa, algodón, melón, tomate, patata u olivo.
- 20 4. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según la reivindicación 3 donde la planta es el olivo.
- 25 5. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en combinación con al menos una cepa de *Trichoderma* seleccionada de la lista que comprende: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 20756, *Trichoderma harzianum* PF1 o *Trichoderma harzianum* CECT 2413.
- 30 6. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según la reivindicación 5 en combinación con las cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 20756, *Trichoderma harzianum* PF1 y *Trichoderma harzianum* CECT 2413.

7. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde las cepas de *Trichoderma* se encuentran en estado esporulado.
- 5 8. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en combinación con productos del metabolismo de al menos una cepa de *Trichoderma* seleccionada de la lista que comprende: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 20756, *Trichoderma*
10 *harzianum* PF1 o *Trichoderma harzianum* CECT 2413.
9. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según la reivindicación 8 en combinación con productos del metabolismo de las cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma atroviride* CECT 20755,
15 *Trichoderma harzianum* CECT 20756, *Trichoderma harzianum* PF1 y *Trichoderma harzianum* CECT 2413.

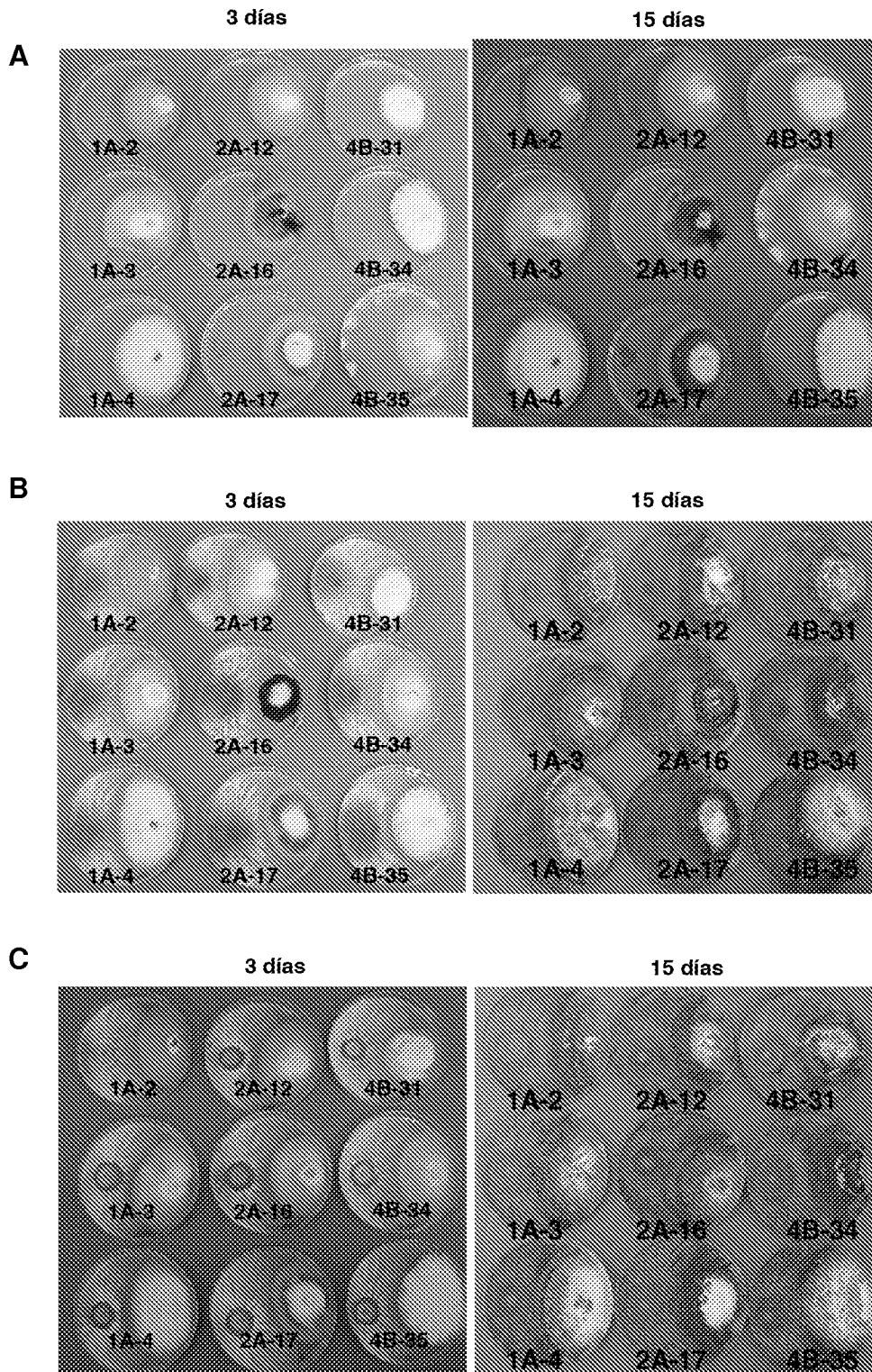
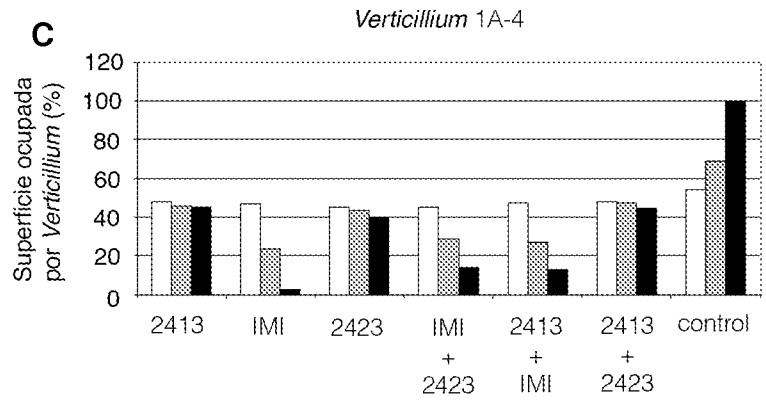
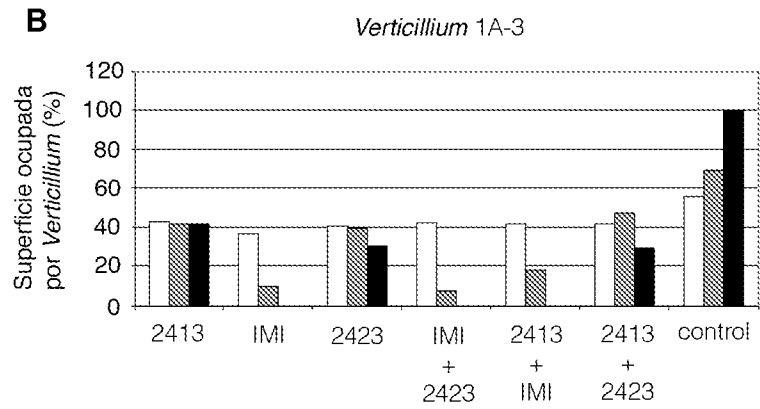
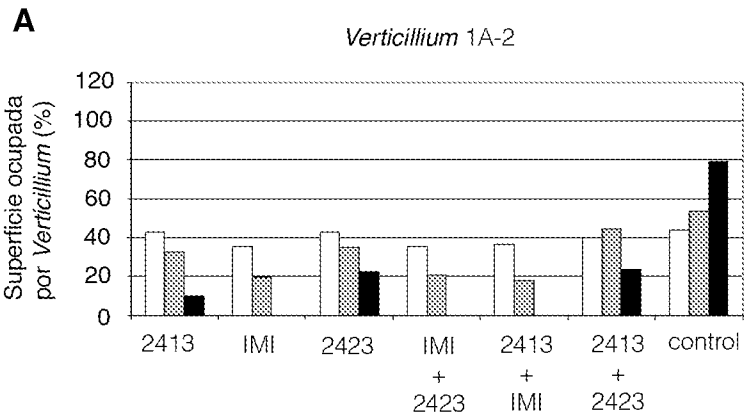
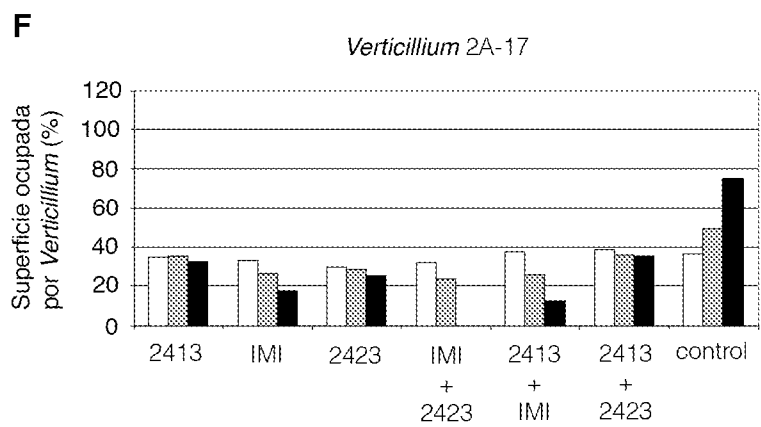
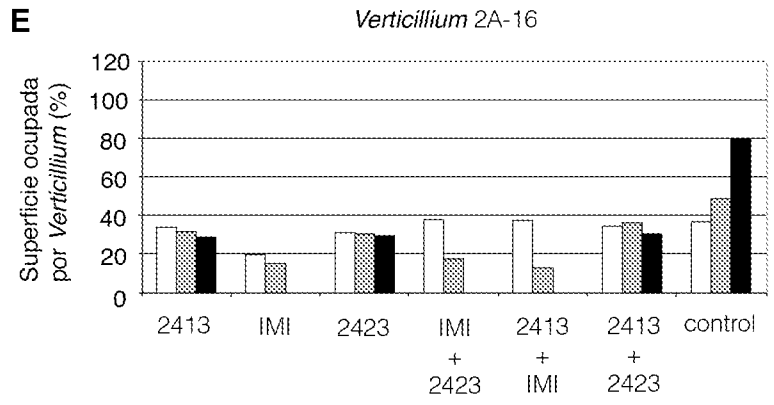
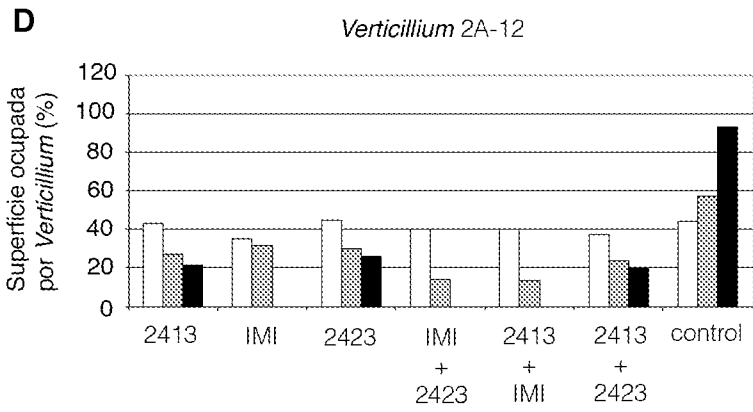


Fig. 1





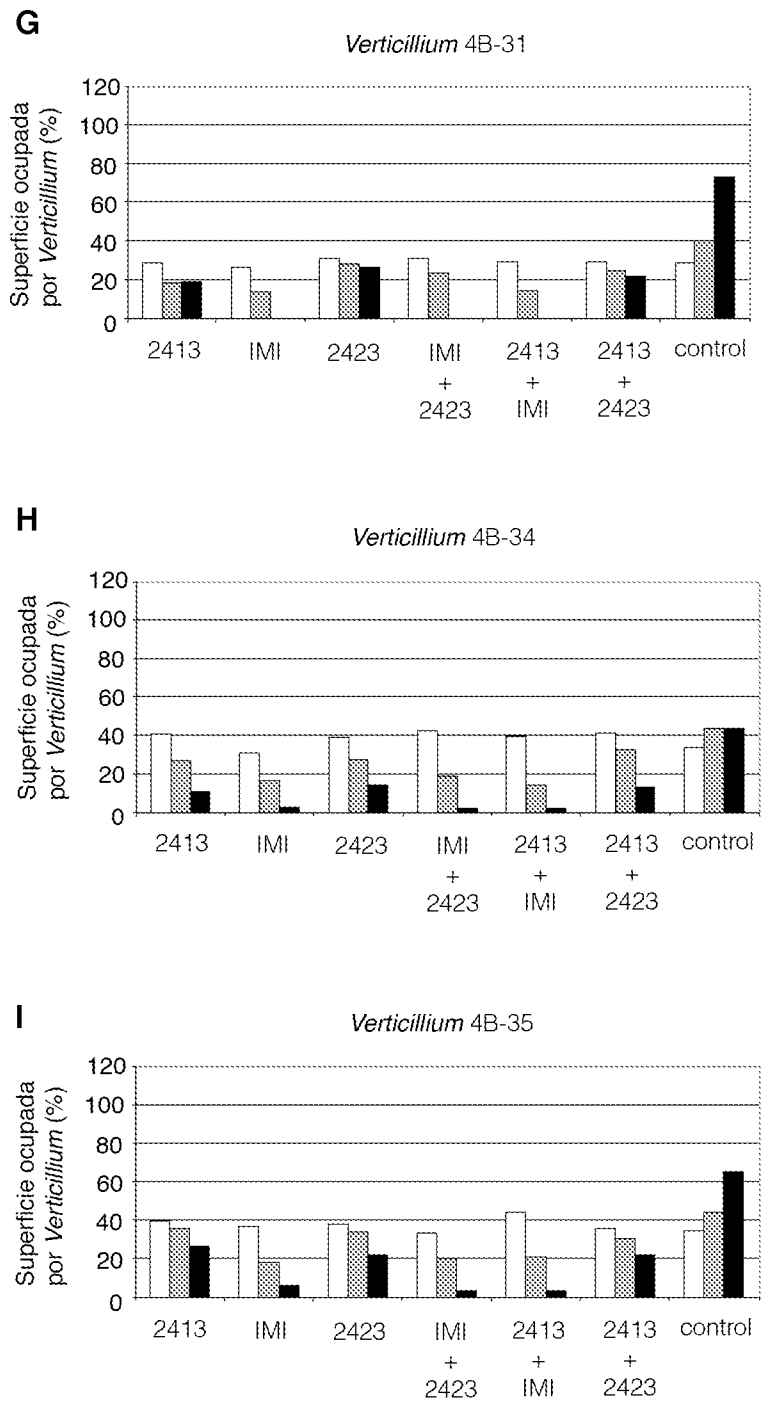


Fig. 2

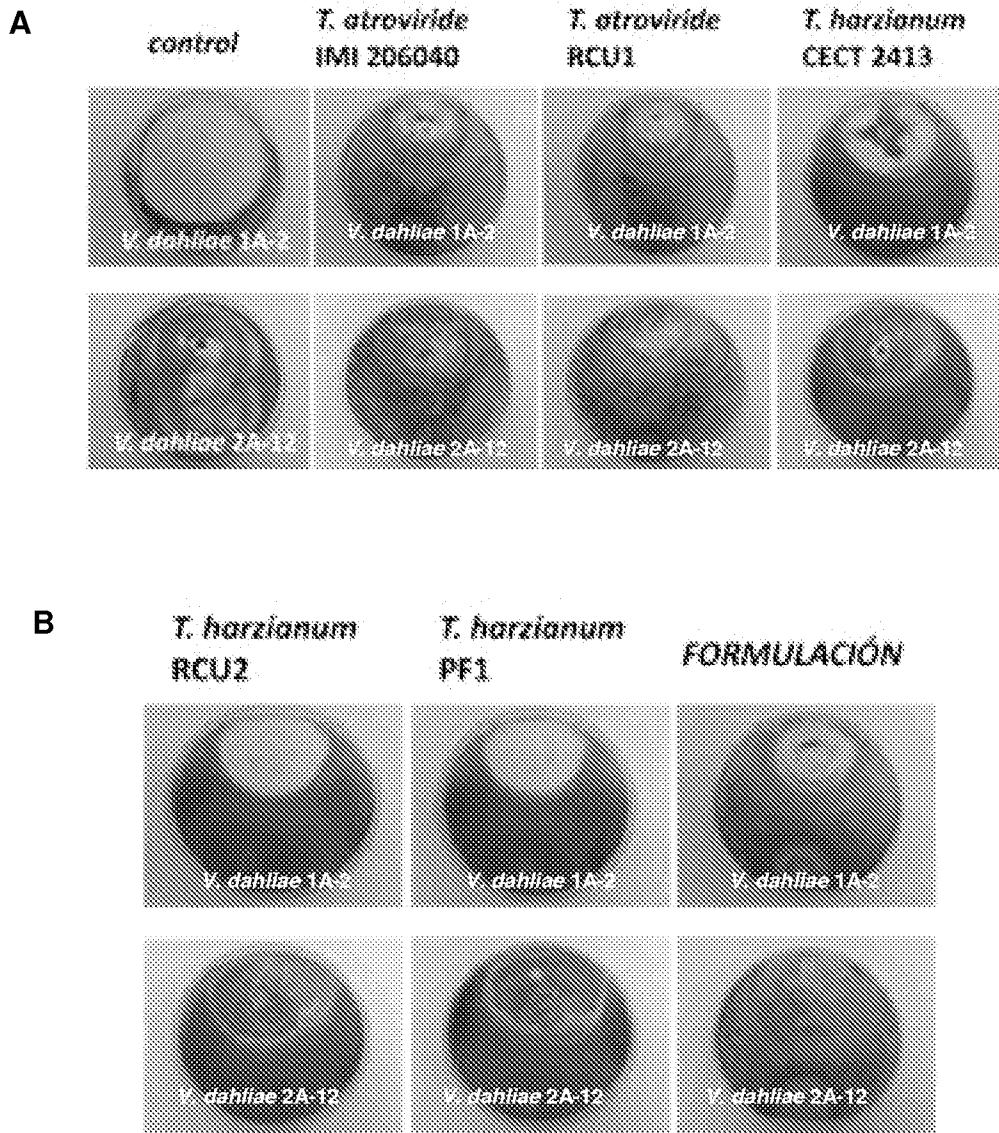


Fig. 3

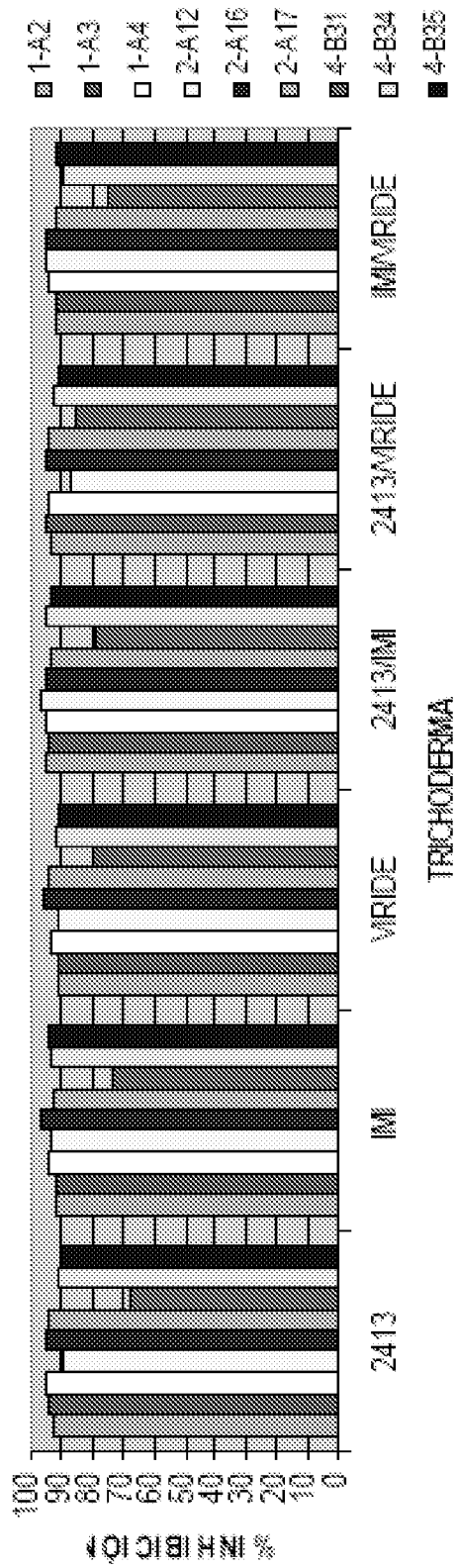


FIG. 4

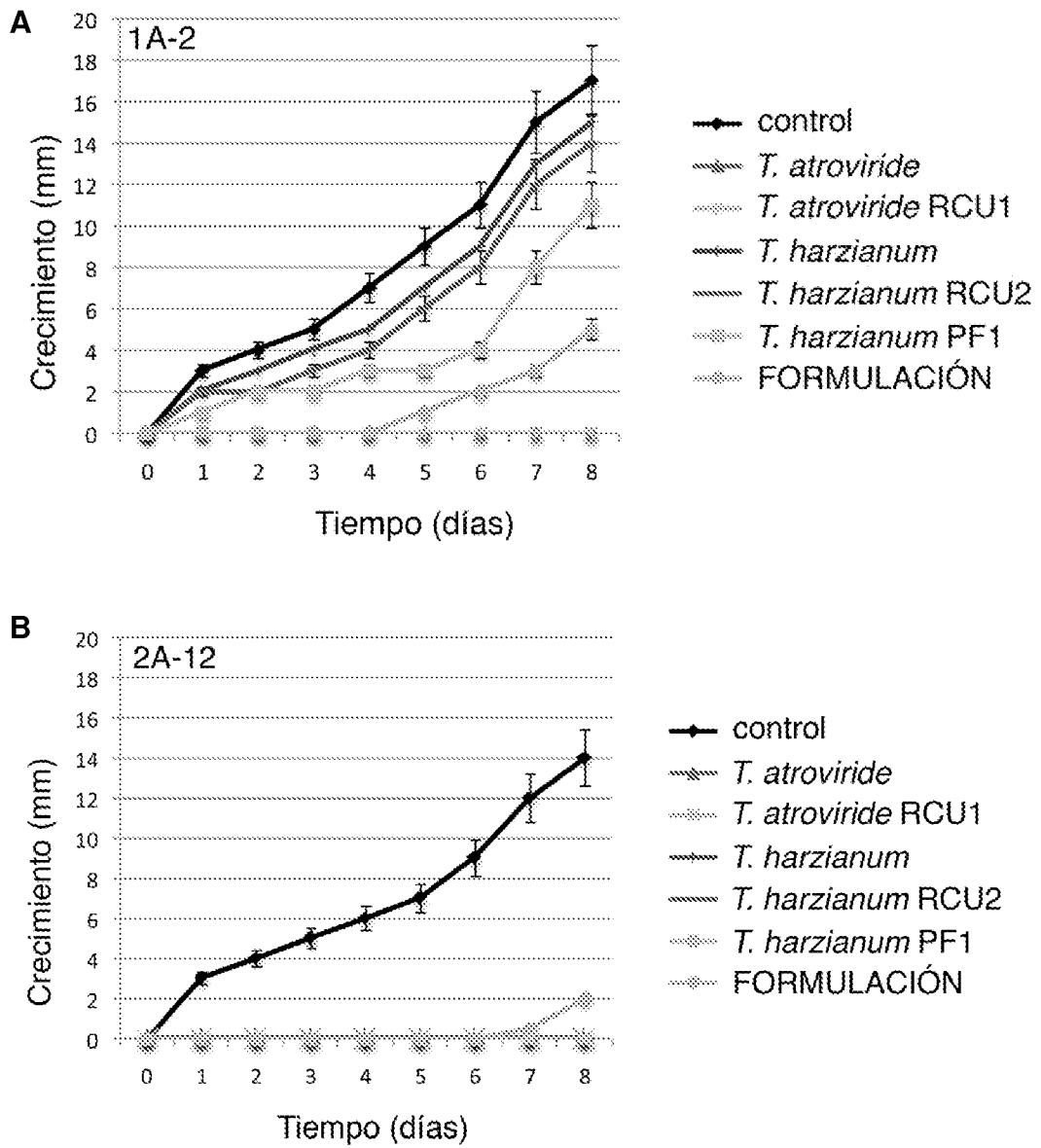


FIG. 5



②① N.º solicitud: 201130608

②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.04.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MCBEATH J H "Trichoderma atroviride, a potential biological control agent of Verticillium dahliae" En: Annual Meeting of the American Phytopathological Society; Phytopathology (1994) Vol. 84, nº 10, pág. 1091.	1-4,7
Y		5-6,8-9
X	MCBEATH J.H. "Biocontrol and Growth Promotion with Cold Tolerant Trichoderma", The IPM Practitioner, Vol. 23, No 2, febrero de 2001, páginas 1-6, [en línea], [recuperado el 18.12.2012]. Recuperado de Internet <URL: http://www.ampacbiotech.net/Articles%20&%20Pubs/ipm.html >	1-4,7
Y		5-6,8-9
Y	FLAMINI et al., "Biocontrol of Verticillium dahliae isolated from olive trees by Trichoderma spp" Journal of Plant Pathology (2005), vol. 87, nº 4, Special issue, pág. 267-309, todo el documento.	5-6,8-9
A	TARUS PK. et al., "Fermentation and antimicrobial activities of extracts from different species of fungus belonging to Genus, Trichoderma", Afr J Health Sci. (2004); 11(1-2): pág.33-42, todo el documento.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.12.2012

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/14 (2006.01)

A01N63/04 (2006.01)

C12R1/885 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.12.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-9	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MCBEATH J H "Trichoderma atroviride, a potential biological control agent of Verticillium dahliae" En: Annual Meeting of the American Phytopathological Society; Phytopathology (1994) Vol. 84, nº 10, pág. 1091.	
D02	MCBEATH J.H. "Biocontrol and Growth Promotion with Cold Tolerant Trichoderma", The IPM Practitioner, Vol. 23, No 2, febrero de 2001, páginas 1-6, [en línea], [recuperado el 18.12.2012]. Recuperado de Internet <URL:http://www. ampacbiotech.net/Articles%20&%20Pubs/ipm.html>	
D03	FLAMINI et al., "Biocontrol of Verticillium dahliae isolated from olive trees by Trichoderma spp" Journal of Plant Pathology (2005), vol. 87, nº 4, Special issue, pág. 267-309, todo el documento.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040 para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, preferiblemente por los patotipos defoliante o no defoliante de *Verticillium dahliae*, agente causante de la verticilosis del olivo. Además, la invención propone el uso de esta cepa de hongos en combinación con otros hongos del género *Trichoderma*.

El documento D01 describe un ensayo de laboratorio en el que se estudia la capacidad potencial de la especie *Trichoderma atroviride* como agente de control biológico del hongo *Verticillium dahliae*. Se identificaron cinco cepas (dos salvajes y tres biotipos) que inhibían el crecimiento y desarrollo de cinco cepas de *Verticillium dahliae*. Aunque los cinco aislados de *Trichoderma atroviride* eran capaces de controlar las cepas de *Verticillium dahliae*, algunos aislados de *Trichoderma atroviride* eran más efectivos que otros.

El documento D02 se refiere a la cepa *Trichoderma atroviride* CHS 861 la cual es capaz de detener totalmente el crecimiento y desarrollo de *Verticillium dahliae*.

El documento D03 describe la actividad antifúngica de *Trichoderma harzianum* sobre *Verticillium dahliae* aislado de olivos.

1.- NOVEDAD

Ninguno de los documentos citados en el estado de la técnica describe el uso la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040, los productos de su metabolismo o combinaciones con otras cepas de *Trichoderma* para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*. En este sentido, es opinión de esta Oficina las reivindicaciones 1-9 son nuevas según el Art. 6.1 LP 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

Las reivindicaciones 1-4 y 7 se refieren al uso de la cepa de hongos *Trichoderma atroviride* IMI 206040 para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*.

Los documentos D01-D02 describen la capacidad antifúngica de la especie *Trichoderma atroviride* frente al hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae*. Según D02, en particular la cepa *Trichoderma atroviride* CHS 861 es capaz de detener totalmente el crecimiento y desarrollo de *Verticillium dahliae*. A la vista de la información aportada en ambos documentos, el experto en la materia interesado en la curación de la verticilosis estaría motivado probar la capacidad antifúngica de la cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040 y obtener los resultados expuestos en la solicitud con unas expectativas razonables de éxito.

En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-4 y 7 carecen del requisito de actividad inventiva según el Art. 8.1

Las reivindicaciones 5-6 y 8-9 tienen como objeto diferentes combinaciones de IMI 206040 con otras cepas de *Trichoderma* o los productos de su metabolismo. En este sentido, a la vista de los resultados descritos en D03 es de aplicación el anterior razonamiento y por tanto se puede concluir que el experto en la materia estaría motivado a combinar la cepa IMI 206040 con distintas cepas de *Trichoderma*, *atroviride* o *harzianum* y obtener unas expectativas razonables de éxito en el tratamiento de la verticilosis. De acuerdo a los ejemplos de la solicitud, la única combinación para la que se aportan datos es la contenida en la reivindicación 6. Dicha composición no presenta un efecto sinérgico debido a la combinación de las distintas cepas sino que su capacidad antifúngica de similar a la de IMI 206040. En este sentido en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 5-6, 8-9 no cumplen el requisito de actividad inventiva según el Art. 8.1.