

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 324**

21 Número de solicitud: 201130606

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:

23.11.2012

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 MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS**

ES 2 391 324 B1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 324**

21 Número de solicitud: 201130606

57 Resumen:

Cepa de trichoderma útil para el tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por microorganismos fitopatógenos.

La invención se refiere a una nueva cepa de hongos perteneciente a la especie *Trichoderma harzianum* resistente a cobre capaz de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos. Por ello, se propone su uso como fertilizante y para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por microorganismos fitopatógenos, preferiblemente por los patotipos defoliante o no defoliante de *Verticillium dahliae*, agente causante de la verticilosis del olivo. Además, debido a su capacidad de resistencia a cobre, la cepa de la invención puede ser utilizada en un método de prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos en combinación con otros agentes antifúngicos.

ES 2 391 324 B1

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Trichoderma* útil para el tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por microorganismos fitopatógenos

5

La presente invención se encuadra en el campo de la agricultura, la microbiología y los productos fitosanitarios, y específicamente se refiere a una nueva cepa de hongos perteneciente a la especie *Trichoderma harzianum* resistente a cobre capaz de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos. La invención también se refiere a una composición que comprende dicha cepa, así como al uso de esta cepa y de esta composición como fertilizantes y para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos.

10

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, horticolas, forestales, ornamentales y malas hierbas. Así, los ataques de verticilosis constituyen un serio problema en diversos cultivos como alcachofa, algodón, melón, tomate, patata u olivo.

20

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 (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 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.

25

30

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.

35

40

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.

45

50

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.

55

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

60

65

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).

5 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).

10 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. 15 En este 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 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).

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 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* 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.

35 En resumen, sería deseable disponer de cepas de *Trichoderma* que proporcionasen un efecto paliativo frente a la infección por microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos, concretamente frente a los patotipos ND y D de *Verticillium dahliae* en variedades de plantas susceptibles de ser infectadas por el mismo, como por ejemplo, el olivo. Para ello, es fundamental que dichas cepas presenten una mejor capacidad de adaptación al medio, de manera que así puedan afrontar con éxito la competencia biológica que tiene lugar en el entorno a tratar. Además, sería interesante que estas cepas permitieran llevar a cabo un tratamiento combinado con fungicidas de naturaleza química.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

45 La presente invención proporciona una nueva cepa de hongos, perteneciente a la especie *Trichoderma harzianum*, capaz de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos. Por ello, se propone su uso como agente de control biológico frente a los mismos, preferiblemente frente a *Verticillium*, más preferiblemente frente a los patotipos defoliante y no defoliante de *Verticillium dahliae*, agente causante de la verticilosis.

50 Los ejemplos de la presente invención demuestran que esta nueva cepa presenta la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae* en aislados del patógeno tanto sensibles como resistentes a hongos del género *Trichoderma*. Por tanto, la cepa descrita en la presente invención posee un elevado valor paliativo frente a la infección de plantas y/o suelos provocada por microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos, más preferiblemente por *Verticillium*, aun más preferiblemente por *Verticillium dahliae*, siendo aplicable tanto en condiciones de vivero como de campo.

60 Además, la cepa descrita en la presente invención es resistente a cobre, por lo que presenta la ventaja de que, en comparación con otras cepas de su mismo género y especie, posee una mejor capacidad de adaptación a medios caracterizados por la presencia de contaminantes metálicos. Estos contaminantes metálicos son empleados comúnmente como antifúngicos y, entre ellos, el cobre es ampliamente utilizado en el sector del olivar. Así, la resistencia a cobre de dicha cepa permite su uso de manera combinada con agentes antifúngicos químicos, lo que deriva en un mejor control y una mayor protección de la planta y/o el suelo frente a microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos en comparación con el simple tratamiento químico o biológico.

65

Por todo ello, un aspecto de la invención se refiere a la cepa de hongos de la especie *Trichoderma harzianum* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de depósito 20756, de ahora en adelante “cepa de la invención” o “RCU2”. Dicha cepa fue depositada en la CECT el 15 de octubre de 2009. Se trata de un mutante espontáneo (no manipulado genéticamente) resistente a cobre, concretamente, aunque sin limitarnos, a 4 mM de Cu_2SO_4 , derivado de *Trichoderma harzianum* CECT 2413. Esta cepa de la invención comparte sus características fenotípicas con la cepa de la que procede. Es capaz de crecer *in vitro* en, por ejemplo, aunque sin limitarnos, los medios de cultivo CECT 54/68, a una temperatura de incubación de, por ejemplo, aunque sin limitarnos, 25°C, durante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, 5 días y en condiciones aerobias.

En una realización preferida, la cepa de la invención se encuentra en estado esporulado. Se entiende por “estado esporulado” el estadio del hongo en el que éste se encuentra en forma de espora. El término “espora” 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 espora produce un nuevo organismo al dividirse por mitosis sin fusión con otra célula, produciendo un gametofito pluricelular. Cuando la espora germina surge de ella una primera hifa, por cuya extensión y ramificación se va constituyendo un micelio.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante “composición de la invención”, que comprende un elemento seleccionado de la lista:

- a. cepa de la invención, preferiblemente en estado esporulado,
 - b. productos del metabolismo de la cepa de la invención,
- o una combinación de (a) y de (b).

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 la invención al medio, 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, antibióticos, enzimas, tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, enzimas hidrolíticas de pared celular, etc.

En los ejemplos de la presente invención se demuestra la eficacia, no solo de la cepa de la invención y de sus productos del metabolismo, sino también de otras cepas de *Trichoderma*, en concreto de *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y *Trichoderma harzianum* PF1, y de los productos del metabolismo de éstas, para inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, de *Verticillium dahliae*. Por ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención además comprende al menos una cepa de *Trichoderma* seleccionada de la lista: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 o *Trichoderma harzianum* PF1.

En los ejemplos de la presente invención también se demuestra la eficacia de la composición de la invención que comprende 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 microorganismos fitopatógenos, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, de *Verticillium dahliae*. Por ello, en una realización más preferida, la composición de la invención comprende un elemento seleccionado de la lista:

- a. cepa de la invención, preferiblemente en estado esporulado,
 - b. productos del metabolismo de la cepa de la invención,
- o una combinación de (a) y de (b),

y además las cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y *Trichoderma harzianum* PF1.

En una realización aun más preferida, la composición de la invención comprende la cepa de la invención y las cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y *Trichoderma harzianum* PF1. Preferiblemente, la proporción de cada cepa en la composición de la invención varía entre un 10% y un 30% del volumen final de la composición (hasta sumar un total de 100% con las cinco cepas); más preferiblemente la proporción de cada cepa en la composición de la invención es de un 20% del volumen final de dicha composición, es decir, las cinco cepas se encuentran en la composición de la invención en la misma proporción (1:1:1:1:1).

En otra realización preferida las cepas de *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y/o *Trichoderma harzianum* PF1 se encuentran en estado esporulado en la composición de la invención.

- 5 En otra realización preferida la composición de la invención además comprende productos del metabolismo de al menos una cepa de *Trichoderma* seleccionada de la lista: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 o *Trichoderma harzianum* PF1.
- 10 Las cepas *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma harzianum* CECT 2413, y los mutantes *Trichoderma atroviride* CECT 20755 y *Trichoderma harzianum* PF1, se encuentran accesibles para un experto en la materia. Las cepas *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y *Trichoderma atroviride* IMI 206040 son identificables 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
- 15 <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 harzianum* CECT 2413, *Trichoderma harzianum* PF1, y el mutante derivado de *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma atroviride* CECT 20755 o RCU1, este último resistente a cobre, comparten las características morfológicas de las cepas de las que proceden.
- 20 Preferiblemente, la composición de la invención además comprende elementos necesarios para el crecimiento y desarrollo de la cepa de la invención y de las cepas de *Trichoderma* mencionadas en el párrafo anterior. Así, dicha composición puede comprender aunque sin limitarnos, fuentes de carbono, sales minerales y/o nutrientes orgánicos e inorgánicos.
- 25 La composición de la invención puede presentarse en cualquier forma de presentación adecuada para su administración o aplicación, por ejemplo, aunque sin limitarse, en forma sólida o líquida. Las formas de presentación líquidas son adecuadas para su pulverización sobre el suelo, la planta o el material vegetal, o bien para crear una solución en la que se sumergen las plantas o el material vegetal, por lo que preferiblemente la composición de la invención se presenta en forma líquida.
- 30 Los ejemplos de la presente invención demuestran que cuando se inoculan microorganismos fitopatógenos tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, *Verticillium dahliae*, en un medio de cultivo donde previamente ha crecido la cepa de la invención y excretado toda clase de metabolitos antes de ser retirada de dicho medio, existe inhibición del crecimiento del microorganismo fitopatógeno. También demuestran dicha inhibición cuando el patógeno se inocula en un medio de cultivo donde previamente han crecido las cepas de *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y/o *Trichoderma harzianum* PF1 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 de la invención y de estas otras cepas de *Trichoderma*, como los metabolitos excretados al medio por las mismas, son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, *Verticillium dahliae*. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa de la invención, preferiblemente en estado esporulado, y/o de los productos de su metabolismo, o de la composición de la invención, para la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por microorganismos fitopatógenos.
- 35 40 45 Una vez excretados, los productos del metabolismo de la cepa de la invención 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 de la invención, el modo de administración puede ser simultáneo o secuencial. O bien, la cepa de la invención 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*.
- 50 55 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 microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos, más preferiblemente por *Verticillium*, aun más preferiblemente por *Verticillium dahliae*, en una planta, en un cultivo o en un suelo. Este término incluye:
- 60 (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.
- 65 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 microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos, más preferiblemente por *Verticillium*, aun más 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 infección pero aún no se ha diagnosticado que la tengan.

5 Se entiende por “infección” la colonización de un organismo huésped, por ejemplo, aunque sin limitarnos, una planta, por agentes patógenos, los cuales en el contexto de la presente invención consisten en microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos, 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. 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 término se incluyen también infecciones de suelos provocadas por microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos.

15 En la presente invención se entiende por “microorganismos fitopatógenos” aquellos microorganismos pertenecientes al reino Fungi o a la clase Oomycetes, capaces de provocar infecciones, y en ocasiones enfermedades, en las plantas. Ejemplos de microorganismos fitopatógenos pertenecientes a la clase Oomycetes son, aunque sin limitarnos, aquellos pertenecientes a los géneros *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora* o *Pythium*. 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. Se engloban dentro de este término los hongos fitopatógenos que causan enfermedades por crecer y multiplicarse en el xilema y/o floema de la planta y, por ende, por bloquear el transporte de agua y nutrientes desde la raíz hacia las hojas o el flujo de savia desde las hojas hacia el resto de la planta. Algunos ejemplos de hongos fitopatógenos son, aunque sin limitarnos, aquellos pertenecientes a los géneros *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Monilia*, *Nectria*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Sclerotium* o *Verticillium*.

20 La presencia de microorganismos fitopatógenos 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 microorganismo fitopatógeno presente en una muestra 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 organismo para determinar el tipo de patógeno presente en la muestra. La presencia de microorganismos fitopatógenos en las plantas o en el suelo también 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 aislada de suelo o de la planta en medios de cultivo selectivos específicos de patógeno conocidos en el estado de la técnica.

30 Algunas cepas pertenecientes al género *Trichoderma* son capaces de ejercer una inhibición del crecimiento no solo sobre un único tipo de microorganismo fitopatógeno sino sobre una amplia variedad de ellos, como es el caso de cepas pertenecientes a las especies *Trichoderma atroviride* o *Trichoderma harzianum*. Por ello, aunque los ejemplos de la presente invención demuestren el efecto de la cepa de la invención y de la composición de la invención, así como de las cepas que la componen por separado, en la inhibición del crecimiento del hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae*, dicha cepa y composición también son de utilidad en la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por otros microorganismos fitopatógenos susceptibles de ser controlados por cepas pertenecientes a las especies *Trichoderma atroviride* o *Trichoderma harzianum*.

35 Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención el microorganismo fitopatógeno pertenece a un género seleccionado de la lista que comprende: *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Monilia*, *Nectria*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Sclerotium* o *Verticillium*. En una realización más preferida, el microorganismo fitopatógeno pertenece al género *Verticillium*. En una realización aun más preferida, el microorganismo fitopatógeno es *Verticillium dahliae*.

40 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 nubilium*, *Verticillium nigrescens* o *Verticillium tricorpus*. Las especies de este género son las causantes de las enfermedades conocidas como verticilosis.

El método más sencillo para identificar a patógenos del género *Verticillium* es, por ejemplo, aunque sin limitarnos, el cultivo en un medio selectivo, como por ejemplo, pero sin limitarnos, 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.

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 de *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 *V. 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 *Verticillium dahliae* son, pero sin limitarnos, alcachofa, algodón, melón, tomate, patata u olivo. Por tanto, en otra realización preferida, la planta afectada por el microorganismo 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.

Como se ha explicado anteriormente, la cepa de la invención es resistente a cobre, metal utilizado como fungicida principalmente en el sector del olivar. Por tanto, esta capacidad de la cepa de la invención permite su uso en un método de tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos de manera combinada con otros agentes antifúngicos. Por ello, otra realización preferida se refiere al uso de la cepa de la invención, y/o de los productos de su metabolismo, o de la composición de la invención, en combinación con otros agentes antifúngicos.

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 comprendidos en la composición de la invención, hongos pertenecientes a otros géneros o bacterias, y sus mezclas, siempre y cuando éstos no sean incompatibles con la cepa de la invención y con los hongos comprendidos en la composición de la invención. Algunos tipos de agentes antifúngicos que podrían emplearse en combinación con la cepa de la invención, y/o con los productos de su metabolismo, o con la composición de la invención, son, aunque sin limitarnos, aquellos compuestos por cloruro de cobre, oxicluro 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 de la invención posee capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos, 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 de la invención es su uso como fertilizante. Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa de la invención, y/o de los productos de su metabolismo, o de la composición de la invención, como fertilizante. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa de la invención, y/o de los productos de su metabolismo, o de la composición de la invención, como fertilizante en plantas de olivo.

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.

La cepa de la invención, y/o los productos de su metabolismo, o la composición de la invención, pueden administrarse a una planta, a un suelo o al material vegetal, incluyendo pero sin limitarnos semillas, hojas o frutos, en combinación con uno o más agentes antifúngicos y/o fertilizantes de manera simultánea o secuencial.

La cepa de la invención, y/o los productos de su metabolismo, así como la composición de la invención, se pueden administrar 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 microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos y para provocar la fertilización. En el sentido utilizado en esta descripción, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad suficiente de la cepa de la invención, y/o de los productos de su metabolismo, o de la composición de la invención, que permita obtener los resultados deseados. Dicha cantidad efectiva puede administrarse en una sola vez o en varias administraciones. En términos de tratamiento, prevención y fertilización, una "cantidad suficiente" es la cantidad suficiente para evitar, paliar, mejorar, estabilizar, revertir, retardar o retrasar los efectos derivados de las infecciones provocadas por microorganismos, preferiblemente hongos, patógenos de plantas, o para estimular el crecimiento de las mismas. Preferiblemente, la cantidad efectiva a administrar de la cepa de la invención en estado esporulado 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 de la invención, y/o de los productos de su metabolismo, así como de la composición de la invención, 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 de la invención, o esporas de la misma pregerminadas, y/o los productos de su metabolismo, o la composición de la invención.

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 las cepas de *Trichoderma* 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 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.

Fig. 2. 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 las 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

5

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la cepa y de la composición de la invención 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.

10

15

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

20

25

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 (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*.

30

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):

35

-*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, o cepa de la invención.

40

Además de estas dos cepas, en los ensayos de la presente invención se utilizaron las siguientes cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma harzianum* CECT 2413, *Trichoderma atroviride* IMI 206040 y *Trichoderma harzianum* PF1. Esta última cepa es un 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). Así, se han realizado también ensayos para comprobar la eficacia *in vitro* de una composición que comprende estas 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.

50

En cuanto a los aislados de *Verticillium dahliae* empleados en los ensayos, se seleccionaron dos aislados con distinta sensibilidad a *Trichoderma*: el aislado 1A-2, representante del patotipo defoliante, y el aislado 2A-12 (más sensible), caracterizado como patotipo no defoliante.

55

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

60

Los ensayos de confrontación directa consistieron en inocular una porción de micelio de los distintos aislados de *V. dahliae* a ensayar (1A-2 ó 2A-12) 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 \square l 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*.

65

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).

5

En la figura 1 se aprecian los resultados de los enfrentamientos con los diferentes aislados de *Verticillium*. Se observó que las cepas de *Trichoderma* empleadas sobrecrecen al patógeno, reduciendo el área ocupada por el mismo. Como se puede observar en esta figura, la composición de las cinco cepas de *Trichoderma* (formulación) es más eficaz frente a los dos aislados de *Verticillium dahliae* ensayados que la mayoría de las cepas que la componen por separado.

10

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

15

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 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

20

cuantitativamente los resultados obtenidos en 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.

25

Los resultados obtenidos se representan en la figura 2 a diferentes tiempos de incubación (días). En este sentido, en ensayos para determinar la capacidad de inhibir el crecimiento de *V. dahliae* que tienen los metabolitos excretados por las diferentes cepas de *Trichoderma* ensayadas, se observaron resultados similares a los anteriores aunque diferentes según la cepa del patógeno. La formulación (combinación de las cinco cepas) fue tan eficaz como las cepas que la 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.

30

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*.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa de la especie *Trichoderma harzianum* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de depósito 20756.
2. Cepa según la reivindicación 1 en estado esporulado.
3. Composición que comprende un elemento seleccionado de la lista:
 - 10 a. cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2,
 - b. productos del metabolismo de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o una combinación de (a) y de (b).
- 15 4. Composición según la reivindicación 3 que además comprende al menos una cepa de *Trichoderma* seleccionada de la lista: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 o *Trichoderma harzianum* PF1.
- 20 5. Composición según la reivindicación 4 donde las cepas de *Trichoderma* se encuentran en estado esporulado.
- 25 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 que además comprende productos del metabolismo de al menos una cepa de *Trichoderma* seleccionada de la lista: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 o *Trichoderma harzianum* PF1.
- 30 7. Uso de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 para la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por microorganismos fitopatógenos.
- 35 8. Uso de la cepa o de la composición según la reivindicación 7 donde el microorganismo fitopatógeno pertenece a un género seleccionado de la lista que comprende: *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Monilia*, *Nectria*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Sclerotium* o *Verticillium*.
- 40 9. Uso de la cepa o de la composición según la reivindicación 8 donde el microorganismo fitopatógeno pertenece al género *Verticillium*.
- 45 10. Uso de la cepa o de la composición según la reivindicación 9 donde el microorganismo fitopatógeno es *Verticillium dahliae*.
11. Uso de la cepa o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10 donde la planta afectada por el microorganismo fitopatógeno se selecciona de la lista que comprende: alcachofa, algodón, melón, tomate, patata u olivo.
12. Uso de la cepa o de la composición según la reivindicación 11 donde la planta es el olivo.
- 50 13. Uso de la cepa o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 en combinación con otros agentes antifúngicos.
- 55 14. Uso de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 como fertilizante.
15. Uso de la cepa o de la composición según la reivindicación 14 como fertilizante en plantas de olivo.

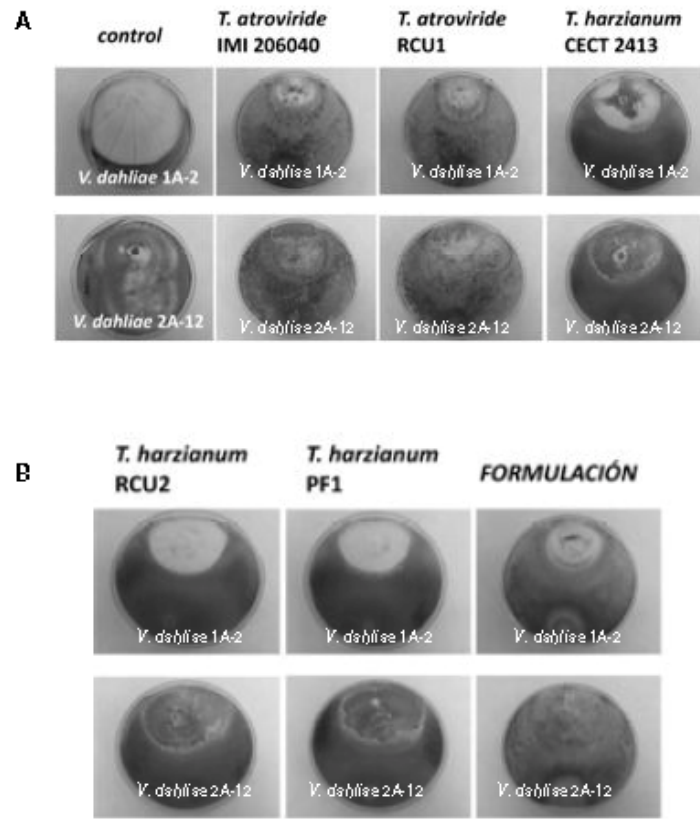


FIG. 1

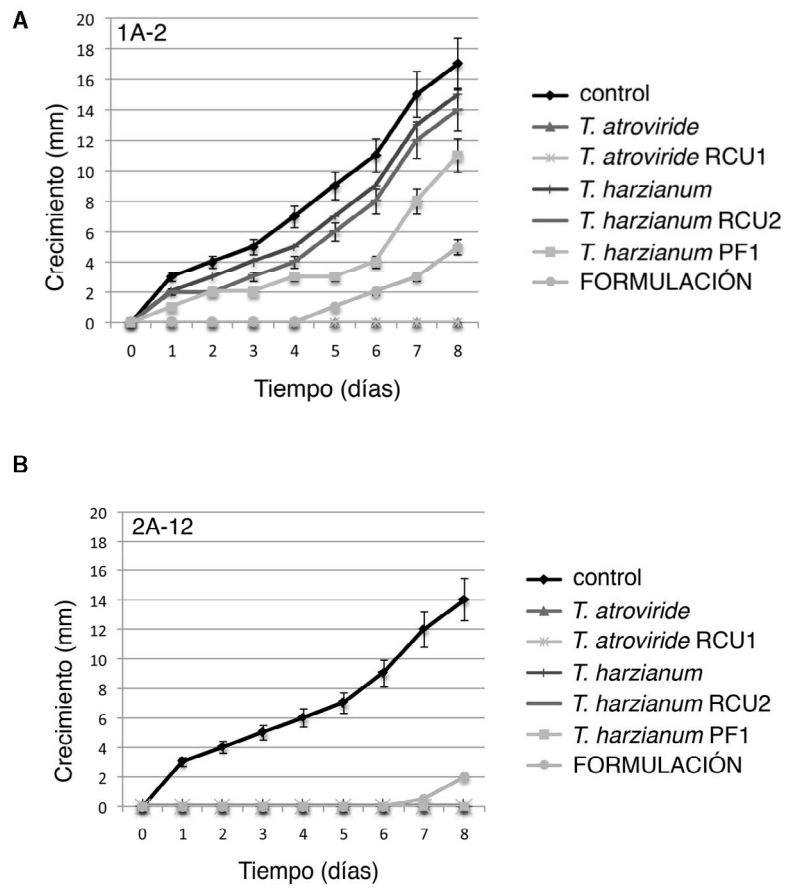


FIG. 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130606

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
A	REY M. ET AL., "Improved antifungal activity of a mutant of Trichoderma harzianum CECT 2413 which produces more extracellular proteins" Applied Microbiology and Biotechnology (2001), vol. 55, nº5, pág. 604-608, todo el documento. Citado en la solicitud.	1-15
A	BENITEZ, T. ET AL., "Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains", International Microbiology (2004), vol. 7, pág. 249-260, todo el documento.	1-15
A	SANTAMARINA M.P. ET AL., "Influence of temperature and water activity on the antagonism of Trichoderma harzianum to Verticillium and Rhizoctonia", Crop Protection (2006), nº 25, pág. 1130-1134, todo el documento.	1-15
A	WO 2009083819 A1 (SIMBIYOTEC BIYOLOGIC URUNLER SANAYI VETICARET ANOMIM SIRKETI) 09.07.2009, todo el documento.	1-15
A	WO 2007094014 A1 (INDIAN INSTITUTE OF HORTICULTURAL RESEARCH) 23.08.2007, todo el documento.	1-15

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
31.10.2012

Examinador
M. Hernandez Cuellar

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: 31.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	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	REY M. ET AL., "Improved antifungal activity of a mutant of <i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2413 which produces more extracellular proteins" <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> (2001), vol. 55, nº 5, pág. 604-608, todo el documento. Citado en la solicitud.	

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 presente invención se refiere a una nuevas cepa de hongo CECT 20756 perteneciente a las especie *Trichoderma harzianum* resistente a cobre y capaz de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos. La invención también se refiere a una composición que comprende dichas cepas, así como al uso de estas cepa y de esta composición como fertilizantes y para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por microorganismos, preferiblemente hongos, fitopatógenos más preferiblemente por *Verticillium dahliae*, agente causante de las verticilosis.

El documento D01 describe el aislamiento de un mutante de la cepa CECT 2413 *Trichoderma harzianum* capaz para producir halos más amplios que el tipo salvaje, al hidrolizar pustulano, un polímero de β -1,6 glucano. El mutante tiene entre dos y cuatro veces más actividad quitinasa y actividades β -1,3 y β -1,6 glucanasa que el tipo silvestre, y produce alrededor de tres veces más proteínas extracelulares y segrega mayor cantidad de un pigmento amarillo (α -pirona). Con este mutante se obtuvieron mejores resultados que con el tipo salvaje en los experimentos in vitro: frente a *Rhizoctonia solani* mostro sobrecrecimiento y esporulación más tempranos y eliminación del patógeno antes y frente *Botrytis cinérea* mostró una protección mejorada de sus uvas.

1.- NOVEDAD

Ninguno de los documentos citados en el informe de la técnica describe una cepa que se pueda considerar igual a la cepa CECT 20756. En consecuencia la reivindicación 1 así como todas las reivindicaciones dependientes que se refieren a la cepa depositada son nuevas de acuerdo al Art 6.1 LP 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

Según se menciona en la página 7 de la descripción la cepa de hongo de la especie *Trichoderma harzianum* 20756, es un mutante espontáneo (no manipulado genéticamente) resistente a cobre, concretamente, aunque sin 30 limitarnos, a 4 mM de Cu_2SO_4 , derivado de *Trichoderma harzianum* CECT 2413 con la cual comparte sus características fenotípicas. En este sentido las divulgaciones referentes a *Trichoderma harzianum* CECT 2413 se pueden considerar como el estado de la técnica más cercano. *Trichoderma harzianum* es un conocido agente de control biológico contra enfermedades de las plantas causadas por hongos. En este sentido el documento D01 en su figuras 2 y 3 demuestra que *Trichoderma harzianum* CECT y el mutante espontáneo PF1 tienen eficacia como agentes de control biológico sobre las infecciones causadas por *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinérea* respectivamente.

Ante la falta de datos que comparen el comportamiento entre CECT 20756 y el mutante PF1, la cepa silvestre CECT 2413 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención. A la vista de los resultados comparativos del ejemplo 1 y figuras 1 y 2 de la solicitud, la diferencia entre CECT 20756 y el agente de control del estado de la técnica, es decir la cepa silvestre, consiste en que la cepa de la solicitud demuestra una eficacia mejorada como agente de biocontrol sobre el hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae*. En este sentido el problema técnico objetivo es la provisión de un agente de biocontrol nuevo más efectivo frente a hongos fitopatógenos. La solución es la cepa CECT 20756 perteneciente a las especie *Trichoderma harzianum*, las composiciones que la comprenden así como sus usos.

Ni la existencia, ni las propiedades ventajosas de la nueva cepa estaban anticipadas ni sugeridas en el estado de la técnica anterior y por lo tanto la reivindicación 1 así como todas las reivindicaciones dependientes que se refieren a la cepa depositada tienen actividad inventiva de acuerdo al Art 8.1 LP 11/1986.