



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①① Número de publicación: **2 109 182**

②① Número de solicitud: 9502266

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>: A01N 63/04

C12N 1/14

//(C12N 1/14

C12R 1:885)

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **07.11.95**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.98**

Fecha de concesión: **14.05.98**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.07.98**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**01.07.98**

⑦③ Titular/es: **Universidad de Salamanca  
Patio de Escuelas Menores, n° 1  
37007 Salamanca, ES  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas.**

⑦② Inventor/es: **Monte Vázquez, Enrique;  
Grondona España, Isabel y  
García Ancha, Isabel**

⑦④ Agente: **Dávila Baz, Angel**

⑤④ Título: **Formulación líquida a base de cepas de los hongos filamentosos Trichoderma harzianum y Trichoderma viride.**

⑤⑦ Resumen:

Formulación líquida a base de cepas de los hongos filamentosos Trichoderma harzianum y Trichoderma viride.

Comprende fuentes de carbono, sales minerales y trazas de elementos como nutrientes orgánicos e inorgánicos, y estructuras vegetativas y reproductoras de cepas del hongo filamentosos Trichoderma harzianum Rifai identificadas como Trichoderma harzianum IMI 352939, Trichoderma harzianum IMI 352940, Trichoderma harzianum IMI 352941, y Trichoderma harzianum CECT 20179; y Trichoderma viride Pers.: Fr. identificada como Trichoderma viride CECT 20178.

La formulación es útil como agente de control biológico, frente a enfermedades de vegetales y de material vegetal y biodeterioro producidos o transmitidos por hongos filamentosos y otros enemigos de las plantas, y como agente de biolixiviación.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 109 182 B1

# ES 2 109 182 B1

## DESCRIPCION

Formulación líquida a base de cepas de los hongos filamentosos trichoderma harzianum y trichoderma viride.

5 Esta invención se relaciona con una formulación con Trichoderma spp. para su aplicación como agente de control biológico de los enemigos de las plantas y material vegetal, entidades biológicas causantes de biodeterioro y como agente de biolixiviación.

10 Más concretamente, la presente invención se relaciona con una formulación líquida, con nutrientes orgánicos e inorgánicos en disolución, que contiene en suspensión estructuras vegetativas y reproductoras de una mezcla de cepas de los hongos filamentosos Trichoderma harzianum Rifai y Trichoderma viride Pers.:Fr.

15 La formulación según la invención es útil como agente de control biológico, frente a enfermedades de vegetales y de material vegetal y biodeterioro producidos o transmitidos por hongos filamentosos y otros enemigos de las plantas, y como agente de biolixiviación.

20 Los componentes químicos y biológicos de la formulación están concentrados para que, durante el transporte y almacenamiento, no se produzca la germinación de las esporas de Trichoderma. Una vez diluida la formulación, inmediatamente antes de su aplicación al suelo, cultivos, etc., los componentes químicos de la misma pueden ser asimilados por las esporas del hongo que iniciará la germinación en pocos minutos. En varias horas se consigue que el microorganismo se multiplique.

25 A través del uso de la formulación según la invención, se pueden conseguir los siguientes efectos beneficiosos:

Controlar enfermedades de vegetales y material vegetal aprovechando la capacidad antagonista que tienen cuatro cepas de T. harzianum y una de T. viride sobre otros hongos del suelo.

30 Reducir la concentración de inóculo de microorganismos patógenos y sus vectores, aprovechando la facilidad de colonización de las cinco cepas de Trichoderma.

35 Reducir la aplicación de pesticidas químicos polucionantes, con incidencia sobre la salud humana y sobre otros seres vivos, actualmente utilizados en Agricultura.

Controlar microorganismos causantes de biodeterioro de alimentos y sus envases, productos almacenados, materiales de construcción, postes, cercados, etc.

40 Obtención selectiva de material geológico por medio de la acción microbiana de las cepas de T. harzianum y de T. viride presentes en la formulación.

En consecuencia, la formulación según la invención puede aplicarse específicamente para:

45 - el control de patógenos y/o vectores de patógenos, de origen fúngico y bacteriano, con importancia en Agricultura, Silvicultura, Jardinería, Praticultura y causantes de alteración y descomposición de material vegetal;

50 - el control de microorganismos causantes de biodeterioro de alimentos y sus envases, materiales de construcción, materias primas y productos manufacturados;

- la colonización de suelos que requieran el establecimiento de una nueva microflora, especialmente después de una desinfección y solarización del suelo;

55 - la extracción biológica de material geológico (Biolixiviación).

60 Puede definirse el Control Biológico como la utilización de organismos naturales o modificados, genes o productos génicos, para reducir los efectos de organismos indeseables, y para favorecer a organismos útiles para el hombre, tales como cultivos, árboles, animales y microorganismos beneficiosos. Más de la mitad de los hongos filamentosos que se utilizan en el Control Biológico de otros hongos patógenos de vegetales, pertenecen a los géneros Trichoderma y Gliocladium.

Trichoderma es un hongo ampliamente distribuido en la naturaleza, fácil de aislar y cultivar, que

crece de forma rápida en muchos sustratos, no afecta al hombre, animales y plantas superiores, actúa como micoparásito (parásito de otros hongos), compite bien por el alimento y por el espacio, produce antibióticos y tiene un sistema enzimático capaz de atacar a una amplia gama de patógenos. Los hongos del género *Trichoderma*, y en particular la especie *Trichoderma harzianum*, constituyen una alternativa biológica más limpia, no acumulable en la cadena alimentaria y respetuosa con el medio ambiente, en contraposición a los pesticidas químicos polucionantes de uso común en Agricultura.

Desde muy antiguo se sabe que existen hongos capaces de controlar a otros hongos y en ello se ha sustentado el equilibrio natural de los microorganismos existentes en el suelo. Así, se conoce el valor potencial de *Trichoderma* como agente de Control Biológico al haberse podido observar que *Trichoderma lignorum* (*T. viride*) era un parásito que se enroscaba en torno a las hifas de otro hongo, *Rhizoctonia solani*, produciendo su muerte. A este respecto, especies tales como *Phytophthora*, *Pythium* y *Rhizopus* así como *Sclerotium rolfsii* podían ser parasitadas por *T. viride*. En base a estos resultados, surgió la posibilidad de utilizar inoculaciones abundantes con *T. viride* para controlar ciertos patógenos.

Aunque *Trichoderma* se reconoció, en principio, como un antagonista de hongos, también se ha descrito como antagonista de ciertas bacterias patógenas. *Trichoderma* ha sido estudiado ampliamente por sus propiedades antibióticas de posible utilización clínica, por sus sistemas enzimáticos en procesos alimentarios y por su poder de biodegradación de residuos sólidos y aguas residuales. Otros estudios han establecido el micoparasitismo de *Trichoderma* sobre muchos Oomicetos, Zigomicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos y hongos anamórficos.

Así, la omnipresencia de *Trichoderma* en suelos naturales y agrícolas de todo el mundo, es una prueba más de que es un excelente competidor por el espacio y por recursos nutritivos.

Por ejemplo, los hongos de la podredumbre de la madera han sido controlados en muchos casos por la presencia o el uso de *Trichoderma* spp., debido a la capacidad de *Trichoderma* para utilizar todos los carbohidratos no estructurales, evitando el establecimiento del Basidiomiceto destructivo y dejando la madera más permeable a la penetración de conservantes químicos.

La capacidad competitiva de *Trichoderma*, y su éxito como agente de Control Biológico, se ven afectados por las propiedades del suelo. Así, se ha observado que el pH tenía influencia sobre el valor relativo de *Trichoderma* como antagonista de *R. solani*, afectando al crecimiento y desarrollo de cada hongo.

Cuando las condiciones de sequía en el suelo se mantienen durante largos períodos de tiempo, las poblaciones de *Trichoderma* descienden. Sin embargo, ha de mencionarse que ciertas cepas de *T. hamatum* y *T. pseudokoningii* están adaptadas a condiciones de elevada humedad del suelo y que *T. viride* y *T. polysporum* están restringidos a áreas donde prevalecen las bajas temperaturas, mientras que *T. harzianum* es más frecuente en regiones de clima templado, y *T. hamatum* y *T. koningii* están ampliamente distribuidos en áreas de condiciones climáticas diversas.

La disponibilidad de hierro es importante para el crecimiento y la capacidad competitiva de *Trichoderma*.

La competición por un determinado sustrato no excluye otros mecanismos de acción, como puede ser el micoparasitismo.

También se ha observado que cuando se aplicaban fungicidas que eran tóxicos para *Trichoderma*, para controlar las manchas de las hojas de cacahuete, había un aumento de la enfermedad causada por *S. rolfsii*.

No obstante, no todos los fungicidas son tóxicos para *Trichoderma*. Así, el fungicida Tiram no tenía efecto sobre *Trichoderma* y *Penicillium*. En suelos tratados con Tiram, *Trichoderma* sobrevivía bien, se multiplicaba, y protegía, frente a *Pythium*, las plántulas de guisante, durante un tiempo considerable, después de que el fungicida alcanzara niveles no tóxicos para el patógeno. Igualmente, se han encontrado efectos beneficiosos similares con *T. harzianum* y el fungicida Metalaxyl ha proporcionado efectos interesantes, aplicado a la semilla de guisante, antes de pildorarla con conidios de *T. harzianum*.

El Benomilo así como otros fungicidas benzimidazólicos (como Tiabendazol y Metiltiofanato), inhiben fuertemente a *Trichoderma*. Captan, Procimidona y Vinclozolin no son inhibidores de *Trichoderma*.

El antagonismo del suelo frente a *Trichoderma* es el factor más importante en la regulación del nivel

## ES 2 109 182 B1

del posible inóculo de este hongo cuando se aplica en un ambiente natural. El conjunto de formas vivas del suelo y la naturaleza física y química del mismo, desempeñan el papel más importante en la reducción del número de propágulos de *Trichoderma*, después de su introducción como agente de Control Biológico.

5 Según el estado de la técnica, el Control Biológico con *Trichoderma* se puede llevar a cabo:

- . Introduciendo el antagonista en el suelo con una base alimenticia, mediante formulaciones con conidios o en polvos, pasta o píldoras de alginato, que contienen biomasa obtenida por fermentación.

10 - . Por tratamiento de semillas. Se requiere menor cantidad de material biológico y el éxito dependerá de:

- los aislamientos utilizados
- el tipo de enfermedad
- 15 - el tipo de cultivo
- la edad de los antagonistas
- la temperatura y pH del suelo
- el tipo de suelo y los microorganismos que existan en él
- 20 - el estado nutricional del antagonista
- la densidad del inóculo en la semilla
- el potencial de inóculo del antagonista en el suelo
- el momento de la siembra

25 - . Por aplicación a partes aéreas de la planta (en hojas, en heridas de árboles o en el momento de la poda) Estas formulaciones suelen ser líquidas.

30 Los primeros resultados prácticos de control de enfermedades de plantas con *Trichoderma* fueron los obtenidos mediante esterilización parcial del suelo, en la lucha contra la podredumbre de la raíz de cítricos debida a *A. mellea*. Se demostró que la esterilización parcial del suelo con pesticidas selectivos debilitaba el crecimiento del patógeno y permitía una proliferación de *Trichoderma*, que era capaz de invadir y matar a *A. mellea*.

35 El tratamiento del suelo con vapor, la solarización y otros métodos, pueden modificar el ecosistema hasta el punto de favorecer la proliferación de *Trichoderma*. El calentamiento subletal de suelos infectados con *A. mellea*, por ejemplo, estimulaba al residente más resistente al calor, *Trichoderma*, que entonces proliferaba y parasitaba a un debilitado *A. mellea*.

40 Como sustratos para la aplicación de *Trichoderma* en el Control Biológico, se han utilizado gránulos de tierra de diatomeas impregnado con melazas, salvado de trigo, gránulos de corteza de árbol, turba más salvado de trigo, granos de cebada, compost de corteza de madera y una formulación de gránulos de material vegetal conteniendo *T. harzianum* y *T. polysporum*. Un *Trichoderma* sp. formulado en aceite de motor, ha sido utilizado con éxito para inocular pinos durante el período de poda.

45 Otros ejemplos incluyen la adición de esporas de *Trichoderma* al suelo junto con un fertilizante líquido, en caso de que los aislamientos utilizados puedan tolerar una presión osmótica alta.

50 Los medios de cultivo para la fermentación líquida deben incluir productos agrícolas accesibles y baratos, tales como glucosa, almidón, maíz hidrolizado y productos de soja, suero y melazas. Así, se han producido inóculos viables de *Trichoderma*, en un tanque de fermentación, para obtener, después de un período de incubación, una gran cantidad de biomasa compuesta de micelio, clamidosporas y algún conidio. También se ha preparado otra formulación, secando al aire la biomasa, moliéndola y diluyendo el polvo con Pyrax<sup>®</sup>, que está disponible comercialmente como transportador para el inóculo del hongo. Otros soportes comerciales que se vienen utilizando con frecuencia en el Control Biológico son el AgroLig<sup>®</sup> y el Pelgel<sup>®</sup>.

60 Una mejora en los sistemas de aplicación es la encapsulación de propágulos, basada en la capacidad de las soluciones acuosas de alginato sódico para reaccionar con cationes de ciertos metales (Ca 2+) y formar geles. Una modificación posterior a esta técnica ha sido la incorporación de transportadores alimenticios (ej. salvado) al alginato, en íntimo contacto con el antagonista, para proporcionar los nutrientes necesarios.

Igualmente, la adición de quitina o de paredes celulares a los inóculos, durante el pildorado de las semillas, aumenta la eficacia de *T. hamatum* como protector de guisantes y rábanos. El compost de corteza de árboles ha demostrado ser un medio excelente para el crecimiento y la liberación de *Trichoderma* spp.

5 Como sistema de aplicación también se ha propuesto el “fluid drilling” para Control Biológico en plantas con semillas pequeñas. El salvado de trigo, junto con turba, constituye una mezcla óptima para la supervivencia de *Trichoderma*, como una fuente de inóculo de Control Biológico, para mezclar en suelo y macetas.

10 También se ha recurrido a la aplicación de micelio joven de *Trichoderma* sobre un sustrato parcialmente consumido, al considerarse que el micelio es mucho más resistente a la fungistasis del suelo que los conidios al germinar. Por tanto, podría parecer más eficaz aplicar *Trichoderma* con una base alimenticia parcialmente consumible, que suplementar *Trichoderma* con nutrientes adicionales, en el momento de su aplicación.

15 Los gránulos de alginato presentan variabilidad en cuanto a calidad y comportamiento en el suelo. Actualmente, y como forma alternativa, se aplica *Trichoderma* a las semillas en forma de monocapa alrededor de las mismas, sobre una matriz sólida, que puede ser de Agro-Lig<sup>®</sup> o carbón bituminoso.

20 A la vista de estos antecedentes, y de acuerdo con la presente invención, se han realizado estudios de selección de cepas de *Trichoderma* para su aplicación como agentes de Control Biológico en el control de enfermedades producidas por hongos del suelo en vegetales, principalmente remolacha.

25 Como resultado de estas investigaciones, se seleccionaron tres cepas de *Trichoderma harzianum*, las cuales han sido depositadas, al amparo del Tratado de Budapest, en la Colección de Cultivos del International Mycological Institute de Egham (Reino Unido), con los números de registro IMI 352939, IMI 352940 e IMI 352941, respectivamente; y una cepa de *Trichoderma viride* y otra de *Trichoderma harzianum* que también se depositaron, al amparo del Tratado de Budapest, en la Colección Española de Cultivos Tipo de Burjasot (Valencia), con los números de registro CECT 20178 y CECT 20179, respectivamente.

30 La eficacia de la aplicación de estos microorganismos en una píldora recubriendo la semilla, como alternativa a los pesticidas químicos habitualmente utilizados, ha sido demostrada en ensayos realizados a nivel de campo, en ambiente natural. Sin embargo, el pildorado de semillas limita el espectro de actuación de *Trichoderma*, al restringir su aplicación al momento de la siembra.

35 Sería por tanto interesante poder aportar una formulación líquida que sirviera de vehículo al inóculo de *Trichoderma*.

40 Partiendo de las premisas de que no existe un agente de Control Biológico universal y que no todas las cepas de *Trichoderma* presentan la misma capacidad antagonista cuando son utilizadas como agentes de Control Biológico, ya que dentro de la especie *T. harzianum* existen diferentes tipos fisiológicos que pueden ser eficaces o ineficaces en cada caso concreto frente a un determinado patógeno, la utilización de una mezcla con cuatro cepas de *T. harzianum* y una de *T. viride* seleccionadas frente a distintos patógenos, amplía el espectro de actuación de la formulación. Por ello, su aplicación en patosistemas en los que se  
45 vean implicados diversos microorganismos (como pueden ser los diferentes hongos que intervienen en las caídas de plántulas o los patógenos causantes de colapsos facilitados por un estrés hídrico, etc.), resulta ventajosa al no existir un único agente, ya sea químico o biológico, que los controle.

50 Dado que cada cepa de *Trichoderma* es sumamente específica frente a unos patógenos concretos, la aplicación de las tres cepas en una mezcla, dentro de la misma formulación, incrementa las posibilidades de éxito del producto bajo condiciones ambientales y patógenos diferentes.

Por tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona ahora una formulación líquida, con nutrientes orgánicos e inorgánicos en disolución, que contiene en suspensión estructuras vegetativas y reproductoras de una, dos, tres o cuatro de las cepas del hongo filamentoso *Trichoderma harzianum* Rifai y/o *Trichoderma viride* Pers.:Fr. anteriormente identificadas.

La formulación según la invención es útil, como ya ha sido indicado, como agente de control biológico y como agente de biolixiviación.

60 Concretamente, la presente invención proporciona una formulación líquida cuya composición cuantitativa (% p/v) es la siguiente:

## ES 2 109 182 B1

	Sorbitol	0.1-6
	K3PO3	0.02-2
	KNO3	0.05-2
5	MgSO4.7H2O	0.002-1
	(NH4)H2PO4	0.02-2
	Cobre	0.02-2
	Zinc	0.02-2
	Molibdeno	0.02-2
10	Boro	0.02-1
	Hierro	0.02-1
	Manganeso	0.02-2

### Componentes biológicos

15	Trichoderma harzianum IMI 352939 c.s.p.	$3 \times 10^5$ - $10 \times 10^7$ conidios/ml
	Trichoderma harzianum IMI 352940 c.s.p.	$3 \times 10^5$ - $10 \times 10^7$ conidios/ml
	Trichoderma harzianum IMI 352941 c.s.p.	$3 \times 10^5$ - $10 \times 10^7$ conidios/ml
20	Trichoderma harzianum CET 20179 c.s.p.	$3 \times 10^5$ - $10 \times 10^7$ conidios/ml
	Trichoderma viride CET 20178 c. s. p.	$3 \times 10^5$ - $10 \times 10^7$ conidios/ml.

La formulación de acuerdo con la invención posee componentes químicos que pueden ser utilizados como nutrientes por *T. harzianum* y *T. viride*, a la vez que mantienen la humedad suficiente para la germinación de propágulos de estos hongos.

La formulación líquida de la invención permite utilizar los antagonistas en cualquier momento y situación, sin necesidad de limitar la aplicación al momento de la siembra, como sucede cuando se formulan los agentes de Control Biológico en medios y sustratos sólidos o recubriendo las semillas y otros materiales de propagación.

La formulación líquida puede mantenerse, concentrada diez veces, en condiciones de refrigeración, a 4°C, durante al menos 1 año; a esta concentración se puede almacenar y transportar hasta su uso. Para ello, basta con diluir diez veces para que la formulación alcance una composición cuantitativa, de acuerdo con la invención, que permitirá la germinación, viabilidad y actividad biológica de los componentes fúngicos de la misma. La formulación puede ser aplicada de forma directa sobre suelo y material vegetal y/o animal y/o fúngico, vivo o muerto; o mezclada con sustancias utilizadas en Agricultura para vehicular otros productos fitosanitarios como fertilizantes, abonos, microgránulos, compost o las aplicadas en la pildoración, revestimiento y encapsulación de semillas y embriones, etc. Como ventaja, la dilución del producto favorece la dispersión de *T. harzianum* y *T. viride*.

Se ofrecen ahora ejemplos de formulaciones líquidas según la invención, en función de la vía de aplicación de las mismas. Ha de entenderse que estos ejemplos se ofrecen sólo con carácter ilustrativo y de ningún modo limitativo del alcance de la invención.

Considerando que es práctica habitual en la aplicación de agentes fitosanitarios que para tratar 1 Ha de cultivo se utilizan 3 litros de producto por vía foliar o 6 litros de producto vía suelo, podrían utilizarse en cada caso 3 y 6 litros de la formulación objeto de invención, concentrada diez veces para su transporte y almacenamiento, y diluida diez veces antes de su uso. Así, para tratamientos foliares, los 3 litros de formulación diez veces concentrada deberán diluirse con 27 litros de agua; y en aplicaciones al suelo los 6 litros de formulación diez veces concentrada deberán diluirse con 54 litros de agua. En situaciones de tratamiento de problemas fitopatológicos serios, conviene triplicar e incluso sextuplicar la dosis de producto por lo que para tratar 1 Ha habrá que concentrar la formulación 30 y 60 veces, según se aplique, respectivamente, sobre la planta o directamente al suelo. En tratamientos foliares, se pueden utilizar 3 litros de formulación 30 veces concentrada (diluida 30 veces en el momento de su uso con 87 litros de agua); y en tratamiento edáficos, 6 litros de formulación 60 veces concentrada (diluida 60 veces en el momento de su uso con 354 litros de agua).

La formulación resultante tenía la siguiente composición:

## ES 2 109 182 B1

### Ejemplo 1

Vía foliar (formulación 30 veces concentrada):

5	Sorbitol	3-180 g
	K <sub>3</sub> PO <sub>3</sub>	0.6-60 g
	KNO <sub>3</sub>	1.5-60 g
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.06-30 g
10	(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6-60 g
	Cobre	0.6-60 g
	Zinc	0.6-60 g
	Molibdeno	0.6-60 g
	Boro	0.6-30 g
15	Hierro	0.6-30 g
	Manganeso	0.6-60 g

Componentes biológicos

20	Trichoderma harzianum IMI 352939 c.s.p.	$9 \times 10^6$ - $3 \times 10^9$ conidios/ml
	Trichoderma harzianum IMI 352940 c.s.p.	$9 \times 10^6$ - $3 \times 10^9$ conidios/ml
	Trichoderma harzianum IMI 352941 c.s.p.	$9 \times 10^6$ - $3 \times 10^9$ conidios/ml
25	Trichoderma harzianum CECT 20179 c.s.p.	$9 \times 10^6$ - $3 \times 10^9$ conidios/ml
	Trichoderma viride CECT 20178 c.s.p.	$9 \times 10^6$ - $3 \times 10^9$ conidios/ml.

### Ejemplo 2

Aplicación sobre suelo (formulación 60 veces concentrada):

30	Sorbitol	6-360 g
	K <sub>3</sub> PO <sub>3</sub>	1.2-120 g
	KNO <sub>3</sub>	3-120 g
35	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.12-60 g
	(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2-120 g
	Cobre	1.2-120 g
	Zinc	1.2-120 g
40	Molibdeno	1.2-120 g
	Boro	1.2-60 g
	Hierro	0.6-60 g
	Manganeso	0.6-120 g

Componentes biológicos

45	Trichoderma harzianum IMI 352939 c.s.p.	$1.8 \times 10^7$ - $6 \times 10^9$ conidios/ml
	Trichoderma harzianum IMI 352940 c.s.p.	$1.8 \times 10^7$ - $6 \times 10^9$ conidios/ml
50	Trichoderma harzianum IMI 352941 c.s.p.	$1.8 \times 10^7$ - $6 \times 10^9$ conidios/ml
	Trichoderma harzianum CECT 20179 c.s.p.	$1.8 \times 10^7$ - $6 \times 10^9$ conidios/ml
	Trichoderma viride CECT 20178 c.s.p.	$1.8 \times 10^7$ - $6 \times 10^9$ conidios/ml.

55 La invención puede desarrollarse a escala industrial ya que los diferentes sistemas de fermentación disponibles permiten obtener rendimientos de inóculo de *T. harzianum* y de *T. viride* de más de 10 gramos de biomasa por 1 litro de sustrato fermentable.

60 A continuación, se ofrece una descripción de los microorganismos usados en las formulaciones líquidas según esta invención.

## ES 2 109 182 B1

### a) Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas

#### *Trichoderma harzianum* INI 352939

5 Posee los atributos morfológicos característicos de la especie *Trichoderma harzianum* Rifai, la conidiogénesis es enteroblástica fialídica, con células conidiógenas con una longitud inferior a 10  $\mu$ m; los conidios son subglobosos, con diámetro superior a 2,4  $\mu$ m; y produce clamidosporas intercalares y terminales con diámetro superior a 10  $\mu$ m.

10 De acuerdo con la metodología usada:

crece en la superficie del medio, con esporulación variable, cuando se cultiva en glucosa 1 % como fuente de carbono;

15 crece muy bien en la superficie del medio, con esporulación variable, cuando se cultiva en etanol 1 % como fuente de carbono;

crece en la superficie del medio, con esporulación, cuando se cultiva en ácido cítrico 1 % y en ácido láctico 1 % como fuentes de carbono;

20 crece en la superficie del medio, con esporulación variable, cuando se cultiva en glicina 0.2 % como fuente de nitrógeno;

25 crece muy bien en la superficie del medio, y esporula débilmente, cuando se cultiva en oxalato amónico 0.2 % como fuente de nitrógeno;

crece en la superficie del medio, con esporulación, cuando se cultiva en urea 0.2 % como fuente de nitrógeno;

30 no crece en la superficie del medio cuando se cultiva en creatina 0.2 % como fuente de nitrógeno; crece a 4 °C;

35 no crece en medios adicionados con cristal violeta a una concentración de 10 mg/litro;

no esporula pero crece, formando agrupaciones de hifas aéreas en forma de rosetón, cuando se cultiva en medios adicionados de selenito sódico a una concentración de 320 mg/litro;

40 desarrolla colonias de diámetro inferior a 25 mm en el medio agar extracto de malta adicionado de 200 mg/litro de sulfato de cobre II, después de 24 horas de incubación a 25 °C;

hidroliza la gelatina y esporula en ese mismo medio de cultivo;

45 crece, con esporulación variable, en agar Czapekamonio después de 10 días de incubación a 25 °C;

crece, con fuerte esporulación, en agar nitrito-sacarosa después de 10 días de incubación a 25 °C;

50 las colonias no alcanzan un diámetro superior a 20 mm en el medio agar glicerol-nitrato, después de 10 días de incubación a 25 °C.

Produce las siguientes actividades enzimáticas extracelulares, medidas con el sistema API ZYM (Biomérieux S.A., Marcy-l' Etoile, Francia): fosfatasa alcalina leucina arilaminidasa, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI -fosfato, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, alfa -glucosidasa, beta-glucosidasa, y N-acetil-beta-glucosaminidasa con intensidad máxima; esterasa, esterasa lipasa, lipasa, valina arilaminidasa, 55 cistina arilamidasa, tripsina, alfa-quimiotripsina, beta-glucuronidasa y alfa -manosidasa, con intensidad moderada; y no se detecta alfa-fucosidasa.

De acuerdo con la metodología usada, presenta los siguientes bandas de isoenzimas, obtenidas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5 % (10 % para la actividad catalasa):

60 actividad fosfatasa alcalina (Rf 0.43-0.51) variable;

actividad catalasa (Rf 0.16-0.34);



## ES 2 109 182 B1

actividad fosfatasa ácida (Rf 0.25-0.31),  
actividad fosfatasa ácida (Rf 0.32-0.43);  
actividad celulasa (Rf 0.28-0.33),  
5 actividad celulasa (Rf 0.45-0.48);  
actividad esterasa (Rf 0.25) variable,  
actividad esterasa (Rf 0.31) débil y variable,  
10 actividad esterasa (Rf 0.55) débil y variable,  
actividad esterasa (Rf 0.57) débil y variable,  
actividad esterasa (Rf 0.65) variable,  
actividad esterasa (Rf 0.74) variable,  
15 actividad esterasa (Rf 0.78) variable,  
actividad esterasa (Rf 0.82-0.84) variable, y  
actividad esterasa (Rf 0.88) variable.

### 20 *Trichoderma harzlanum* INI 352940

Posee los atributos morfológicos característicos de la especie *Trichoderma harzianum* Rifai, la conidiogénesis es enteroblástica fialídica, con células conidiógenas con una longitud inferior a 10  $\mu$ m; los conidios son subglobosos, con diámetro superior a 2,4  $\mu$ m; y produce clamidosporas intercalares con diámetro inferior a 10  $\mu$ m.

De acuerdo con la metodología usada:

30 crece en la superficie del medio, con esporulación variable, cuando se cultiva en glucosa 1% como fuente de carbono;

crece en la superficie del medio, pero no esporula, cuando se cultiva en etanol 1% como fuente de carbono; crece en la superficie del medio, con esporulación, cuando se cultiva en ácido cítrico 1% como fuente de carbono;

35 crece débilmente en la superficie del medio, pero esporula, cuando se cultiva en ácido láctico 1% como fuente de carbono;

40 crece débilmente en la superficie del medio, con esporulación variable, cuando se cultiva en glicina 0.2% como fuente de nitrógeno;

crece débilmente en la superficie del medio, con esporulación, cuando se cultiva en oxalato amónico 0.2% como fuente de nitrógeno;

45 crece débilmente en la superficie del medio, con fuerte esporulación, cuando se cultiva en urea 0.2% como fuente de nitrógeno;

no crece en la superficie del medio cuando se cultiva en creatina 0.2% como fuente de nitrógeno;

50 no crece a 4°C;

no crece en medios adicionados con cristal violeta a una concentración de 10 mg/litro;

55 no esporula pero crece, formando agrupaciones de hifas aéreas en forma de copos, cuando se cultiva en medios adicionados de selenito sódico a una concentración de 320 mg/litro;

desarrolla colonias de diámetro superior a 30 mm en el medio agar extracto de malta adicionado de 200 mg/litro de sulfato de cobre II, después de 24 horas de incubación a 25°C;

60 produce un pigmento amarillo difusible en el medio de cultivo, cuando se incuba en agar extracto de malta adicionado de 200 mg/litro de sulfato de cobre II, después de 14 días de incubación a 25°C, en oscuridad; hidroliza fuertemente la gelatina pero no esporula en ese mismo medio de cultivo;

## ES 2 109 182 B1

crece, con poca esporulación, en agar Czapek-amonio y agar nitrito-sacarosa, después de 10 días de incubación a 25°C;

5 las colonias no alcanzan un diámetro superior a 20 mm y desarrollan, de forma variable, un pigmento difusible de color naranja en el medio agar glicerol-nitrato, después de 10 días de incubación a 25°C.

Produce las siguientes actividades enzimáticas extracelulares, medidas con el sistema API ZYM (Biomérieux S.A., Marcy-l' Etoile, Francia): fosfatasa alcalina esterasa lipasa, leucina arilaminidasa, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfato, alfa-galactosidasa y beta-glucosidasa, con intensidad máxima; es-  
10 terasa, lipasa, valina arilaminidasa, cistina arilaminidasa, tripsina, alfa-quimiotripsina, beta-galactosidasa, alfa-glucosidasa, N-acetil-beta-glucosaminidasa y alfa-manosidasa, con intensidad moderada; y no se detectan beta-glucuronidasa y alfa-fucosidasa.

De acuerdo con la metodología usada, presenta los siguientes bandas de isoenzimas, obtenidas me-  
15 diante electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% (10% para la actividad catalasa):

actividad fosfatasa alcalina (Rf 0.43-0.51);  
actividad catalasa (Rf 0.16-0.34);  
20 actividad fosfatasa ácida (Rf 0.25-0.31) débil y variable,  
actividad fosfatasa ácida (Rf 0.32-0.43);  
actividad esterasa (Rf 0.53) variable,  
actividad esterasa (Rf 0.57),  
25 actividad esterasa (Rf 0.63) débil y variable,  
actividad esterasa (Rf 0.67) variable,  
actividad esterasa (Rf 0.69) variable,  
actividad esterasa (Rf 0.74) variable,  
30 actividad esterasa (Rf 0.76),  
actividad esterasa (Rf 0.78) variable, y  
actividad esterasa (Rf 1.00).

35 *Trichoderma harzianum* INI 352941

Posee los atributos morfológicos característicos de la especie *Trichoderma harzianum* Rifai, la conidiogénesis es enteroblástica fialídica, con células conidiógenas con una longitud superior a 10 mm; los conidios son subglobosos, con diámetro superior a 2,4 mm; y produce clamidosporas terminales con diámetro inferior a 10 mm.  
40

De acuerdo con la metodología usada.

45 crece muy bien en la superficie del medio, con esporulación variable, cuando se cultiva en glucosa 1% como fuente de carbono;

crece muy bien en la superficie del medio, con esporulación variable, cuando se cultiva en etanol 1% como fuente de carbono;

50 crece en la superficie del medio, con buena esporulación, cuando se cultiva en ácido cítrico 1%;

crece débilmente en la superficie del medio, y es capaz de esporular, cuando se cultiva en ácido láctico 1% como fuente de carbono;

55 crece en la superficie del medio, con esporulación variable, cuando se cultiva en glicina 0.2% como fuente de nitrógeno;

crece muy bien en la superficie del medio, con buena esporulación, cuando se cultiva en oxalato amónico 0.2% como fuente de nitrógeno;

60 crece en la superficie del medio, con esporulación, cuando se cultiva en urea 0.2% como fuente de nitrógeno;

## ES 2 109 182 B1

no crece en la superficie del medio cuando se cultiva en creatina 0.2% como fuente de nitrógeno;  
crece a 4°C;

5 no crece en medios adicionados de cristal violeta a una concentración de 10 mg/litro;

no esporula, pero crece, formando agrupaciones de hifas aéreas en forma de rosetón, cuando se cultiva en medios adicionados de selenito sódico a una concentración de 320 mg/litro;

10 desarrolla colonias de diámetro inferior a 25 mm en el medio agar extracto de malta adicionado de 200 mg/litro de sulfato de cobre II, después de 24 horas de incubación a 25°C;

hidroliza fuertemente la gelatina y esporula en ese mismo medio de cultivo;

15 crece y esporula bien en agar Czapek-amonio después de 10 días de incubación a 25°C;

crece, con fuerte esporulación, en agar nitrito-sacarosa después de 10 días de incubación a 25°C;

20 las colonias no alcanzan un diámetro superior a 20 mm en el medio agar glicerol-nitrato, después de 10 días de incubación a 25°C.

Produce las siguientes actividades enzimáticas extracelulares, medidas con el sistema API ZYM (Biomérieux S.A., Marcy-l' Etoile, Francia): fosfatasa alcalina, esterasa, leucina arilaminidasa, fosfatasa ácida, naftol -AS-BI-fosfato, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, y  
25 N-acetil-beta -glucosaminidasa con intensidad máxima; esterasa lipasa, lipasa, valina arilaminidasa, cistina arilamidasa, tripsina, alfa-quimiotripsina, beta-glucuronidasa y alfa -manosidasa, con intensidad moderada; y no se detecta alfa-fucosidasa.

30 De acuerdo con la metodología usada, presenta los siguientes bandas de isoenzimas, obtenidas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% (10% para la actividad catalasa):

actividad fosfatasa alcalina (Rf 0.40-0.48);

actividad catalasa (Rf 0.16-0.34);

35 actividad fosfatasa ácida (Rf 0.32-0.43) variable;

actividad celulasa (Rf 0.10-0.13),

actividad celulasa (Rf 0.15-0.18),

actividad celulasa (Rf 0.28-0.33),

40 actividad celulasa (Rf 0.45-0.48);

actividad esterasa (Rf 0.25),

actividad esterasa (Rf 0.31) débil,

45 actividad esterasa (Rf 0.51),

actividad esterasa (Rf 0.53),

actividad esterasa (Rf 0.55),

actividad esterasa (Rf 0.62),

50 actividad esterasa (Rf 0.65),

actividad esterasa (Rf 0.78),

actividad esterasa (Rf 0.82-0.84), y

55 actividad esterasa (Rf 1.00).

*Trichoderma harzianum* CECT 20179

60 Posee los atributos morfológicos característicos de la especie *Trichoderma harzianum* Rifai, la conidiogénesis es enteroblástica fialídica, con células conid genas con una longitud superior a 10 mm y anchura algo mayor de 3 mm; los conidios son subglobosos, con diámetro superior a 2,4 mm; y produce clamidosporas terminales e intercalares con diámetro superior a 10 mm.

## ES 2 109 182 B1

De acuerdo con la metodología usada:

crece muy bien en la superficie del medio, con esporulación variable, cuando se cultiva en glucosa 1 % como fuente de carbono;

5

crece muy bien en la superficie del medio, con esporulación débil, cuando se cultiva en etanol 1 % como fuente de carbono;

10 crece en la superficie del medio, con buena esporulación, cuando se cultiva en ácido cítrico 1 % como fuente de carbono;

crece débilmente en la superficie del medio, y es capaz de esporular, cuando se cultiva en ácido láctico 1 % como fuente de carbono;

15

crece muy bien en la superficie del medio, con esporulación variable, cuando se cultiva en glicina 0.2 % como fuente de nitrógeno;

crece muy bien en la superficie del medio, con buena esporulación, cuando se cultiva en oxalato amónico 0.2 % como fuente de nitrógeno;

20

crece en la superficie del medio, con esporulación débil, cuando se cultiva en urea 0.2 % como fuente de nitrógeno;

no crece en la superficie del medio cuando se cultiva en creatina 0.2 % como fuente de nitrógeno;

25

no crece a 4°C;

no crece en medios adicionados de cristal violeta a una concentración de 10 mg/litro;

30

no esporula, pero crece en medios adicionados de selenito sódico a una concentración de 320 mg/litro;

desarrolla colonias de diámetro superior a 25 mm y normalmente inferior a 31 mm, en el medio agar extracto de malta adicionado de 200 mg/litro de sulfato de cobre II, después de 24 horas de incubación a 25°C;

35

no hidroliza la gelatina, pero esporula en ese mismo medio de cultivo;

crece y esporula muy bien en agar Czapek-amonio después de 10 días de incubación a 25°C;

40

crece muy bien, con fuerte esporulación, en agar nitrito-sacarosa después de 10 días de incubación a 25°C;

las colonias no alcanzan un diámetro superior a 20 mm en el medio agar glicerol-nitrato, después de 10 días de incubación a 25°C.

45

Produce las siguientes actividades enzimáticas extracelulares, medidas con el sistema API ZYM (Biomérieux S.A., Marcy-l'Etoile, Francia): fosfatasa alcalina, leucina arilaminidasa y naftol-AS-BI - fosfatoesterasa con intensidad máxima; esterasa lipasa, lipasa, valina arilaminidasa, cistina arilamidasa, fosfatasa ácida, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, N-acetil-beta-glucosaminidasa y alfa-manosidasa con intensidad moderada; y no se detectan esterasa, tripsina, alfa-quimiotripsina, beta-glucuronidasa y alfa-fucosidasa.

50

De acuerdo con la metodología usada, presenta las siguientes bandas de isoenzimas, obtenidas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5 % (10 % para la actividad catalasa):

55

actividad catalasa (Rf 0.20-0.30),

actividad catalasa (Rf 0.26-0.34);

actividad fosfatasa ácida (Rf 0.10),

60

actividad fosfatasa ácida (Rf 0.28-0.43);

actividad malato deshidrogenasa (Rf 0.01),

actividad malato deshidrogenasa (Rf 0.16-0.17),

## ES 2 109 182 B1

actividad malato deshidrogenasa (Rf 0.20-0.24),  
actividad malato deshidrogenasa (Rf 0.30-0.40);  
actividad celulasa (Rf 0.28-0.33),  
5 actividad celulasa (Rf 0.40) variable,  
actividad celulasa (Rf 0.42-0.54) variable,  
actividad celulasa (Rf 0.69-0.82);  
10 actividad esterasa (Rf 0.44),  
actividad esterasa (Rf 0.50),  
actividad esterasa (Rf 0.72) débil,  
actividad esterasa (Rf 0.75) débil,  
15 actividad esterasa (Rf 0.77),  
actividad esterasa (Rf 0.82-0.84),  
actividad esterasa (Rf 0.87)  
actividad esterasa (Rf 0.92-0.95).

20 *Trichoderma viride* CECT 20178

Posee los atributos morfológicos característicos de la especie *Trichoderma viride* Pers.:Fr., la conidiogénesis es enteroblástica fialídica, con células conidiógenas con una longitud inferior a 10  $\mu$ m y anchura inferior a 3  $\mu$ m; los conidios son ovales, con superficie rugosa, con diámetro superior a 2,4  $\mu$ m; y produce clamidosporas terminales e intercalares con diámetro superior a 10  $\mu$ m.

De acuerdo con la metodología usada:

30 crece muy bien en la superficie del medio, con esporulación abundante, cuando se cultiva en glucosa 1 % como fuente de carbono;

crece muy bien en la superficie del medio, con esporulación muy abundante, cuando se cultiva en etanol 1 % como fuente de carbono;

35 crece en la superficie del medio, con esporulación variable, cuando se cultiva en ácido cítrico 1 % como fuente de carbono;

40 crece muy bien en la superficie del medio, y es capaz de esporular débilmente, cuando se cultiva en ácido láctico 1 % como fuente de carbono;

crece en la superficie del medio, pero no esporula, cuando se cultiva en oxalato amónico 1 % como fuente de carbono;

45 crece de forma variable en la superficie del medio, con esporulación también variable, cuando se cultiva en nitrito sódico 0.2 % como fuente de nitrógeno;

crece muy bien en la superficie del medio, con buena esporulación, cuando se cultiva en glicina 0.2 % como fuente de nitrógeno;

50 crece de forma variable en la superficie del medio, con buena esporulación, cuando se cultiva en oxalato amónico 0.2 % como fuente de nitrógeno;

55 crece en la superficie del medio, con buena esporulación, cuando se cultiva en urea 0.2 % como fuente de nitrógeno;

crece en la superficie del medio y esporula cuando se cultiva en creatina 0.2 % como fuente de nitrógeno;

no crece a 4°C;

60 crece bien en medios adicionados de cristal violeta a una concentración de 10 mg/litro, y débilmente en medios adicionados de cristal violeta a una concentración de 50 mg/litro;

## ES 2 109 182 B1

no esporula, pero crece, formando agrupaciones de hifas aéreas en forma de rosetón, en medios adicionados de selenito sódico a una concentración de 320 mg/litro;

5 desarrolla colonias con un diámetro 21 % inferior al del testigo sin agente inhibidor, en el medio agar extracto de malta adicionado de 200 mg/litro de sulfato de cobre II, después de 24 horas de incubación a 25°C;

10 desarrolla colonias con un diámetro superior a 65 mm, en el medio agar extracto de malta adicionado de 200 mg/litro de sulfato de cobre II, después de 14 días de incubación a 25°C;

hidroliza la gelatina, con esporulación abundante en ese mismo medio de cultivo;

15 crece, con micelio aéreo abundante, y esporula muy bien en agar Czapek-amonio después de 10 días de incubación a 25°C;

crece bien y esporula en agar nitrito-sacarosa después de 10 días de incubación a 25°C;

crece bien en el medio agar glicerol-nitrato, después de 10 días de incubación a 25°C.

20 Produce las siguientes actividades enzimáticas extracelulares, medidas con el sistema API ZYM (Biomérieux S.A., Marcy-l' Etoile, Francia): fosfatasa alcalina, esterasa lipasa, valina arilaminidasa y alfa-glucosidasa, con intensidad máxima; leucina arilaminidasa, naftol-AS-BI-fosfatoesterasa, cistina arilaminidasa, fosfatasa ácida, alfa-galactosidasa, beta -glucosidasa, N-acetil-beta-glucosaminidasa y alfa -manosidasa con intensidad moderada; y no se detectan lipasa, tripsina, alfa-quimiotripsina, beta -galactosidasa, beta-glucuronidasa y alfa-fucosidasa.

### b) *Características moleculares*

30 Los microorganismos utilizados en la formulación objeto de patente son cepas sin adiciones ni deleciones de DNA, que han sido aislados de la Naturaleza y su genoma no ha sido modificado. El hecho de que sean cepas naturales dificulta su caracterización al no existir DNA exógeno que sirva de marcador de cada una de ellas.

35 Dado que se trata de microorganismos fenotípicamente muy parecidos, y que sus atributos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos pueden ser difíciles de valorar, hemos recurrido a la búsqueda, dentro del genoma de estos microorganismos, de marcadores moleculares que fueran estables, a nivel de especie y de cepa, para poder caracterizar e identificar cada uno de los tres aislamientos utilizados en la formulación.

40 Nos fijamos en la región ITS11-ITS4, que engloba el gen que codifica al RNAr 5.8 S, y sintetizamos cebadores para amplificarla mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

45 Se amplificó el gen *5.8S rRNA* con las regiones adyacentes al mismo, usando los cebadores ITS1 e ITS4, mediante PCR, obteniéndose fragmentos de aproximadamente 0,6 kbp, para las cepas de *T. harzianum* IMI 352939, IMI 352940 e IMI 352941, según se observó mediante electroforesis en gel de agarosa, al 1 %.

50 El gen *5.8S rRNA* (nucleótidos del 212 al 358) posee una gran semejanza con otros hongos filamentosos, y, por tanto, entre las 3 cepas de *T. harzianum*. Las diferencias se encontraron en las regiones adyacentes al gen, fundamentalmente en las secuencias comprendidas entre los nucleótidos 100 y 200, y entre los nucleótidos 408 y 440.

Las secuencias características obtenidas para las 3 cepas de *T. harzianum* se indican a continuación:

55

60

## ES 2 109 182 B1

*Trichoderma harzianum* IMI 352939 (región ITS1-ITS4 del gen 5.8S rRNA):

568 nucleótidos:

5           AGGGATC ATTACCGAGTTT ACAACTCCCAA ACCCAATGTGAA OCATA  
          CCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCA  
          GGCGCCCGCCGGAGGGACCAACCAAACCTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTT  
10          ATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATC  
          TCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG  
          CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTG  
          GCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGG  
          CGTTGGGGACCTCGGGAGCCCTAAGA CGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGG  
15          CGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCG  
          CGGCGCGTCCACGTCCGTA AAAACACCCA ACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGG  
          TAGGAATACCCGCTGAACTTAA

20          *Trichoderma harzianum* IMI 352940 (región ITS1-ITS4 del gen 5.8S rRNA):

582 nucleótidos:

25           AGGGATC ATTACCGAGTTT ACAACTCCCAA ACCCAATGTGAA CGTTA  
          CCAAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCA  
          AGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCTAAAACCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTT  
          TTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAA  
30          ACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG  
          ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC  
          GCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAAC  
          CCTCCGGGGGGTCGGCGTTGGGATCGGCCCTCCCTAGCGGGTGGCCGTCTCC  
          GAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACTCGC  
35          ATCGG GAGCGCGCGCGTCCACAGCCGTAAACACCCA ACTTCTGAAATGTTGAC  
          CTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA

40          *Trichoderma hazianum* INI 352941 (región ITS1-ITS4 del gen 5.8S rRNA):

568 nucleótidos:

45           AGGGATC ATTACCGAGTTT ACAACTCCCAA ACCCAATGTGAA OCATA  
          CCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCA  
          GGCGCCCGCCGGAGGGACCAACCAAACCTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTT  
          ATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATC  
50          TCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG  
          CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTG  
          GCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGG  
          CGTTGGGGACCTCGGGAGCCCTAAGA CGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGG  
          CGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCG  
55          CGGCGCGTCCACGTCCGTA AAAACACCCA ACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGG  
          TAGGAATACCCGCTGAACTTAA

60          Las secuencias correspondientes a las cepas *Trichoderma harzianum* IMI 352939 y *Trichoderma harzianum* IMI 352941, han resultado ser idénticas para este gen. Por este motivo no se han secuenciado las regiones ITS1-ITS4 del gen 5.8S rRNA de las cepas *Trichoderma harzianum* CECT 20179 y *Trichoderma viride* CECT 20178. No obstante, se están buscando nuevos atributos moleculares que permitan identificar cada una de estas cepas sin la necesidad de recurrir a marcadores exógenos.

# ES 2 109 182 B1

## REIVINDICACIONES

1. Una formulación líquida a base de cepas de los hongos filamentosos *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, **caracterizada** porque presenta la siguiente composición cuantitativa en % p/v:

5	Sorbitol	0.1-6
	K3PO3	0.02-2
	KNO3	0.05-2
10	MgSO4.7H2O	0.002-1
	(NH4)H2PO4	0.02-2
	Cobre	0.02-2
	Zinc	0.02-2
	Molibdeno	0.02-2
15	Boro	0.02-1
	Hierro	0.02-1
	Manganeso	0.02-2

Componentes biológicos: al menos una cepa elegida del grupo consistente en:

20	<i>Trichoderma harzianum</i> IMI 352939 c.s.p. $3 \times 10^5$ - $10 \times 10^7$ conidios/ml,
	<i>Trichoderma harzianum</i> IMI 352940 c.s.p. $3 \times 10^5$ - $10 \times 10^7$ conidios/ml,
	<i>Trichoderma harzianum</i> IMI 352941 c.s.p. $3 \times 10^5$ - $10 \times 10^7$ conidios/ml
25	<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 20179 c.s.p. $3 \times 10^5$ - $10 \times 10^7$ conidios/ml,
	<i>Trichoderma viride</i> CECT 20178 c.s.p. $3 \times 10^5$ - $10 \times 10^7$ conidios/ml y mezclas de tales cepas.

30 2. El uso de una formulación líquida según la reivindicación 1 de *Trichoderma harzianum* IMI 352939, *Trichoderma harzianum* IMI 352940, *Trichoderma harzianum* IMI 352941, *Trichoderma harzianum* CECT 20179 y *Trichoderma viride* CECT 20178 sólo o mezclados, como agentes de control biológico de los enemigos de las plantas y material vegetal, y entidades biológicas causantes de biodeterioro.

35

40

45

50

55

60





INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: A01N 63/04, C12N 1/14 // (C12N 1/14, C12R 1:885)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US-5288634-A (HARMAN GARY E et al.) 22.02.94 * Columnas 3,4 *	1,2
A	US-4915944-A (CHET ILAN et al.) 10.04.90 * Columna 2, líneas 13-47 *	1,2
A	US-5266316-A (ELAD YIGAL et al.) 30.11.93 * Reivindicaciones 1-5 *	1,2
A	EP-0285987-A (CORNELL RES FOUNDATION INC) 12.10.88 * Columna 1, línea 32 - columna 2, línea 27 *	1,2
A	EP-0124388-A (SANTERRE ORSAN) 07.11.84 * Página 1, párrafo 1 *	1,2
A	PHYTOPATHOLOGY, Vol. 76, núm. 3, 1986, páginas 306-312, L. MIHUTA-GRIMM et al.: "Trichoderma spp. as biocontrol agents of rhizoctonia damping-off radish in organic soil and comparison of four delivery systems." * Página 307, columna 2, párrafo 3 *	1,2
A	PLANT PATHOLOGY, Vol. 38, 1989, páginas 277-286, G.C. PAPAIVIZAS et al.: "Effect of Gliocladium and Trichoderma on damping-off and blight of snapbean caused by Sclerotium rolfsii in the greenhouse." * Tabla 1 *	1,2

**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 n.º:

**Fecha de realización del informe**

24.11.97

**Examinador**

A. Polo Díez

**Página**

1/2



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: A01N 63/04, C12N 1/14 // (C12N 1/14, C12R 1:885)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FR-2345921-A (SEPPIC) 28.10.77 * Reivindicaciones *	1,2

**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 n.º:

**Fecha de realización del informe**  
24.11.97

**Examinador**  
A. Polo Díez

**Página**  
2/2