

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 728**

21 Número de solicitud: 201130609

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

C12R 1/885 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

15.04.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.12.2012

71 Solicitantes:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

ES 2 393 728 A1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 728**

21 Número de solicitud: 201130609

57 Resumen:

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

La invención se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma harzianum* CECT 2413 para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, preferiblemente por los patotipos defoliante o no defoliante de *Verticillium dahliae*, agente causante de la Verticilosis del olivo. Además, la invención propone el uso de esta cepa de hongos en combinación con otros hongos del género *Trichoderma*.

ES 2 393 728 A1

DESCRIPCIÓN

Cepa de *trichoderma* útil para el tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por hongos pertenecientes al género *verticillium*

La presente invención se encuadra en el campo de la agricultura, la microbiología y los productos fitosanitarios, y específicamente se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma harzianum* CECT 2413 para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, más preferiblemente por *Verticillium dahliae*, agente causante de la verticilosis.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

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, hortalizas, 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.

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.

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.

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.

Algunas cepas del hongo filamentoso *Trichoderma*, como por ejemplo cepas pertenecientes a la especie *Trichoderma harzianum*, han sido utilizadas como agentes de control biológico contra hongos patógenos de plantas, debido a su capacidad protectora tanto contra hongos del suelo que infectan las raíces como contra los que producen enfermedades en las partes aéreas. Algunas de estas cepas tienen también un efecto fertilizante sobre las plantas, estimulando su vigor, crecimiento y mecanismos de defensa.

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

En el caso del patógeno *Verticillium dahliae*, se han caracterizado una amplia gama de antagonistas del mismo, entre los que se encuentran diferentes cepas de *Trichoderma* (Berg et al., 2005, *Applied and Environmental Microbiology*, 71:8, pp. 4203–4213).

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 líticas y 2) buen desarrollo en condiciones de competición.

Esto último también depende de: 3) las condiciones de producción y preparación del inóculo y de 4) factores ambientales, incluyendo la presencia de fungicidas y/o pesticidas. En este 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 líticas 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.

En resumen, sería deseable disponer de agentes de control biológico que proporcionasen un efecto no solo paliativo sino también preventivo frente a la infección por los patotipos ND y D del hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae* en variedades de plantas susceptibles de ser infectadas por el mismo, como por ejemplo, el olivo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención propone el uso de la cepa de hongos *Trichoderma harzianum* CECT 2413 para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, más preferiblemente por los patotipos defoliante o no defoliante de *Verticillium dahliae*, agente causante de la verticilosis.

Los ejemplos de la presente invención demuestran que la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413 es capaz de inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae*, y esta inhibición se observa tanto en aislados del patógeno con capacidad defoliante como no defoliante, y tanto sensibles como resistentes a hongos del género *Trichoderma* (Fig. 2 y 3). Además, los ejemplos demuestran que esta cepa posee un efecto preventivo frente a la infección de plantas por *Verticillium dahliae* mejorado con respecto a otras cepas de su mismo género (Fig. 6 y 7). Por tanto, la cepa de hongos *Trichoderma harzianum* CECT 2413 posee un elevado valor paliativo y preventivo frente a la infección de plantas y/o suelos provocada por hongos fitopatógenos del género *Verticillium*, más preferiblemente por *Verticillium dahliae*, siendo aplicable tanto en condiciones de vivero como de campo.

Por todo ello, un aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma harzianum* CECT 2413, y/o de los productos de su metabolismo, para la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*.

La cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413 es conocida en el estado de la técnica y por tanto se encuentra accesible para un experto en la materia. Dicha cepa es identificable tanto por sus características morfológicas, las cuales se pueden encontrar descritas en bases de datos para *Trichoderma* tales como por ejemplo, pero sin limitarnos, la recogida en <http://www.isth.info>, como por ciertos marcadores moleculares, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, la secuencia de los espaciadores internos de los genes de rRNA, ITS1 e ITS2.

Tal y como se utiliza en la presente invención, el término “productos del metabolismo” o “metabolitos” se refiere a cualquier molécula excretada por la cepa de hongos *Trichoderma harzianum* CECT 2413, 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.

Una vez excretados, los productos del metabolismo de la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413 pueden ser aislados y aplicados, solos o en combinación con dicha cepa, directamente a la planta, tanto a las raíces como a la parte aérea, al material vegetal, incluyendo pero sin limitarnos semillas, hojas o frutos, o al suelo. Cuando los productos del metabolismo son administrados en combinación con la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413, el modo de administración puede ser simultáneo o secuencial. O bien, la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413 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*.

La cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413, y/o los productos de su metabolismo, pueden administrarse a, por ejemplo pero sin limitarnos, una planta, tanto a las raíces como a la parte aérea, al material vegetal, incluyendo pero sin limitarnos semillas, hojas o frutos, o al suelo, en una cantidad efectiva para el tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*. En el sentido utilizado en esta descripción,

el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad suficiente de la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413, y/o de los productos de su metabolismo, que permita obtener los resultados deseados. Dicha cantidad efectiva puede administrarse en una sola vez o en varias administraciones. En términos de tratamiento y prevención, una "cantidad suficiente" es la cantidad suficiente para evitar, paliar, mejorar, estabilizar, revertir, retardar o retrasar los efectos derivados de las infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*. Preferiblemente, la cantidad efectiva a administrar de la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413 es de entre 10^4 y 10^6 esporas/ml de agua de riego, y más preferiblemente de 10^5 esporas/ml (a partir de $1,4 \times 10^{11}$ unidades formadoras de colonias/g).

El modo de administración de la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413, y/o de los productos de su metabolismo, puede realizarse, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante el agua de riego, pulverización, rociado, revestimiento, fumigación, impregnación, mezcla con el sustrato, inmersión de la raíz de la planta en una solución que comprenda la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413, o esporas de la misma pregerminadas, y/o los productos de su metabolismo.

Los "hongos fitopatógenos" son aquellos organismos pertenecientes al reino Fungi capaces de provocar infecciones, y en ocasiones enfermedades, en las plantas por medio de alteraciones en su metabolismo, mediante por ejemplo, aunque sin limitarnos, la secreción de enzimas, toxinas, fitoreguladores y otras sustancias y, además, mediante la absorción de nutrientes de la planta para su propio crecimiento. Los hongos fitopatógenos de la presente invención son aquellos pertenecientes al género *Verticillium*.

El género de hongos *Verticillium* pertenece a la división o filo *Ascomycota*, familia *Plectosphaerellaceae* e incluye diversos grupos que comprenden parásitos y saprófitos de plantas, insectos, nemátodos, huevos de moluscos y otros hongos, por lo que el género tiene un amplio rango de grupos taxonómicos, conteniendo unas 51 especies, entre las que se encuentran, aunque sin limitarnos, *Verticillium dahliae*, *Verticillium alboatrum*, *Verticillium nubilum*, *Verticillium nigrescens* o *Verticillium tricorpus*. Las especies de este género son las causantes de las enfermedades conocidas como verticilosis.

La presencia de hongos fitopatógenos del género *Verticillium* en las plantas o en el suelo puede detectarse mediante técnicas de biología molecular conocidas en el estado de la técnica para llevar a cabo dicha identificación, como por ejemplo, amplificando mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) o Q-PCR, una región del genoma del hongo fitopatógeno presente en una muestra biológica aislada del suelo o de la planta y comparando el producto de amplificación obtenido con las secuencias génicas disponibles en bases de datos tales como, por ejemplo, pero sin limitarnos, GenBank, específicas de organismos del género *Verticillium*, para determinar el tipo de patógeno presente en la muestra. La presencia de hongos fitopatógenos del género *Verticillium* en las plantas o en el suelo también podría llevarse a cabo mediante técnicas inmunohistoquímicas, como por ejemplo, pero sin limitarnos, ELISA; o bien mediante el crecimiento *in vitro* de los organismos contenidos en la muestra biológica aislada de suelo o de la planta en medios de cultivo selectivos específicos de patógenos pertenecientes al género *Verticillium*. En este sentido, el método más sencillo para identificar patógenos de este género mediante el cultivo en un medio selectivo es, por ejemplo, aunque sin limitarnos, el cultivo en medio PDA (Agar Patata-Dextrosa) a temperatura ambiente, donde las colonias crecen de color blanco y el color del fondo de las placas es entre incoloro y amarillento. Algunos cultivos pueden tener un perfil bajo con bordes redondeados y formando curvas. Las especies *Verticillium alboatrum*, *Verticillium dahliae* y *Verticillium tricorpus* presentan colonias postradas y de un color amarillo anaranjado en medio de cultivo PDA, la especie *Verticillium nubilum* forma clamidosporas globosas y *Verticillium nigrescens* forma clamidosporas abundantes.

En una realización preferida, el hongo fitopatógeno es *Verticillium dahliae*. La especie *Verticillium dahliae* se caracteriza por la producción de conidióforos con fiáldas dispuestas en verticilo y la formación de numerosos microesclerocios, estructuras de resistencia. El hongo se puede encontrar en el suelo en forma de micelio y conidios, o en forma de microesclerocios. Algunos cultivos infectados por este patógeno pueden ser asintomáticos, pero en general se distinguen dos tipos de síndromes derivados de esta infección que origina la enfermedad denominada "verticilosis": apoplejía y decaimiento lento. Los síntomas iniciales del primer síndrome consisten en la pérdida de coloración de las hojas, más tarde se produce una seca rápida de brotes y ramas que suele comenzar desde la punta y que puede ocasionar la muerte del árbol. La corteza de las ramas afectadas puede tomar color morado o púrpura y a veces también se observa una coloración marrón en los tejidos del xilema. Los síntomas más típicos del decaimiento lento son la necrosis y momificado de las inflorescencias mientras que las hojas generalmente se desprenden, excepto las del extremo. En el contexto de la presente invención, se incluyen dentro del término "*Verticillium dahliae*" tanto su patotipo defoliante (D) como su patotipo no defoliante (ND). El patotipo D de *Verticillium dahliae* se caracteriza por provocar la caída generalizada de las hojas verdes de ramos infectados, al contrario que el patotipo ND. El diagnóstico de la infección por uno u otro patotipo de *Verticillium dahliae* podría llevarse a cabo mediante técnicas de visualización fenotípica en base a la característica sintomática anteriormente mencionada, o bien mediante técnicas moleculares de caracterización de ambos patotipos, como por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante PCR (Mercado-Blanco *et al.*, 2002, *Olivae: revista oficial del Consejo Oleícola Internacional*, 94:41-46).

Ejemplos de plantas susceptibles a la infección por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, y preferiblemente por *Verticillium dahliae*, son, pero sin limitarnos, alcachofa, algodón, melón, tomate, patata u olivo. Por tanto, en otra realización preferida, la planta afectada por el hongo fitopatógeno se selecciona de la lista que

comprende: alcachofa, algodón, melón, tomate, patata u olivo. En una realización más preferida, la planta es el olivo. Cuando *Verticillium dahliae* infecta al olivo provoca lo que se denomina “verticilosis del olivo o VO”. La presente invención se refiere tanto a las variedades de olivo muy susceptibles al patotipo D, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, *Picual* o *Arbequina*, como a las variedades susceptibles al patotipo ND.

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

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

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

Se entiende por “infección” la colonización de un organismo huésped, por ejemplo, aunque sin limitarnos, una planta, por agentes patógenos, los cuales en el contexto de la presente invención consisten en hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, que invaden el organismo y se multiplican en él, produciendo sustancias tóxicas. El organismo colonizador es perjudicial para el funcionamiento normal y la supervivencia del huésped, por lo que se califica al agente como patógeno o, en el contexto de la presente invención, como fitopatógeno. 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 hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, preferiblemente por *Verticillium dahliae*.

25 En los ejemplos de la presente invención se demuestra la eficacia, no solo de la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y de sus productos del metabolismo, sino también de otras cepas de *Trichoderma*, en concreto de *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 20756, *Trichoderma harzianum* PF1 y *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y de los productos del metabolismo de éstas, para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, como por ejemplo, pero sin limitarnos, de *Verticillium dahliae*. Por ello, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma harzianum* CECT 2413, y/o de los productos de su metabolismo, en combinación con al menos una cepa de *Trichoderma* seleccionada de la lista que comprende: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 20756, *Trichoderma harzianum* PF1 o *Trichoderma atroviride* IMI 206040, para la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*.

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

45 Las cepas *Trichoderma harzianum* PF1, *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y *Trichoderma harzianum* CECT 20756 pueden administrarse a una planta, tanto a las raíces como a la parte aérea, al material vegetal, incluyendo pero sin limitarnos semillas, hojas o al suelo, para el tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, preferiblemente por *Verticillium dahliae*, de manera simultánea o secuencial. Además, dichas cepas pueden administrarse en combinación con elementos necesarios para su crecimiento y desarrollo, como por ejemplo aunque sin limitarnos, fuentes de carbono, sales minerales y/o nutrientes orgánicos e inorgánicos.

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

Se entiende por “estado esporulado” el estadio del hongo en el que éste se encuentra en forma de 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.

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

Las cepas *Trichoderma harzianum* PF1, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, y los mutantes *Trichoderma atroviride* CECT 20755 y *Trichoderma harzianum* CECT 20756, se encuentran accesibles para un experto en la materia. *Trichoderma harzianum* PF1 es una cepa mutante derivada de *Trichoderma harzianum* CECT 2413 inducida con nitrosoguanidina, caracterizada por su capacidad superexcretora de enzimas hidrolíticas (glucanasas, proteasas y/o quitinasas). Esta cepa comparte las características morfológicas de la cepa de la que procede. La cepa *Trichoderma atroviride* IMI 206040 es identificable tanto por sus características morfológicas, las cuales se pueden encontrar descritas en bases de datos para *Trichoderma* tales como por ejemplo, pero sin limitarnos, la recogida en <http://www.isth.info>, como por ciertos marcadores moleculares, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, la secuencia de los espaciadores internos de los genes de rRNA, ITS1 e ITS2. El mutante derivado de *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma atroviride* CECT 20755 o RCU1, y el mutante derivado de *Trichoderma harzianum* CECT 2413, *Trichoderma harzianum* CECT 20756 o RCU2, ambos resistentes a cobre, comparten las características morfológicas de las cepas de las que proceden.

Las cepas *Trichoderma atroviride* CECT 20755 o RCU1 y *Trichoderma harzianum* CECT 20756 o RCU2 son resistentes a cobre, metal utilizado como fungicida principalmente en el sector del olivar. Por tanto, esta capacidad permite el uso de las mismas de manera combinada con otros agentes antifúngicos en un método de tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*. Por ello, otra realización preferida se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma harzianum* CECT 2413, y/o de los productos de su metabolismo, en combinación con otros agentes antifúngicos, para la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*. Cuando la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413, y/o los productos de su metabolismo, se administra en combinación con una de las cepas RCU1 o RCU2, o con las dos, puede ser utilizada en combinación con otros agentes antifúngicos de naturaleza química.

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

Por otro lado, los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* con frecuencia actúan como agentes fertilizantes. Por esta razón, y porque además la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413 posee capacidad para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, los cuales pueden comprometer la viabilidad y el desarrollo de la planta a la que infectan o la idoneidad del suelo de cultivo, otra aplicación de la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y/o de los productos de su metabolismo, es su uso como fertilizante, preferiblemente en plantas

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

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

Fig. 2. Muestra el crecimiento de distintos aislados de *Verticillium dahliae* durante los ensayos de enfrentamiento directo con las cepas *Trichoderma harzianum* CECT 2413 (2413), *Trichoderma viride* CECT 2423 (2423) o *Trichoderma atroviride* IMI 206040 (IMI), o combinaciones de las mismas, a los 3 (blanco), 6 (gris) y 15 (negro) días de incubación. (A) Aislado de *V. dahliae* 1A-2. (B) Aislado de *V. dahliae* 1A-3. (C) Aislado de *V. dahliae* 1A-4. (D) Aislado de *V. dahliae* 2A-12. (E) Aislado de *V. dahliae* 2A-16. (F) Aislado de *V. dahliae* 2A-17. (G) Aislado de *V. dahliae* 4B-31. (H) Aislado de *V. dahliae* 4B-34. (I) Aislado de *V. dahliae* 4B-35.

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

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

Fig. 5. Muestra el crecimiento de dos aislados de *Verticillium dahliae*, 1A-2 (A) y 2A-12 (B), en medios donde habían crecido previamente las cepas de *Trichoderma*, *Trichoderma atroviride* IMI 206040 (*T. atroviride*),

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

Fig. 6. Muestra la evolución del número total de hojas a lo largo del tiempo en plantas de olivo inoculadas con *V. dahliae* (vert.) y tratadas previamente con cepas de *T. harzianum* CECT 2413 (*T. Harz.*), *T. asperellum* (*T. Asp.*) o la mezcla ambas cepas. Cont.+vert.: Control, plantas de olivo tratadas con *V. dahliae* pero no con *Trichoderma*.

Fig. 7. Muestra el análisis de la sintomatología de la enfermedad mediante la escala de severidad de daño a lo largo del tiempo en plantas de olivo previamente tratadas con cepas de *T. harzianum* CECT 2413 (*T. Harz.*), *T. asperellum* (*T. Asp.*) o con la mezcla de ambas cepas, durante el tratamiento con *V. dahliae* (vert.). Cont.+vert.: Control, plantas de olivo tratadas con *V. dahliae* pero no con *Trichoderma*.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413 en el tratamiento y prevención de infecciones causadas por patotipos defoliantes y no defoliantes 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.

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

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

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

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):

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

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

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

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

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

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

Los ensayos de confrontación directa consistieron en inocular una porción de micelio de los distintos aislados de *V. dahliae* a ensayar en un extremo de cajas de Petri conteniendo medio de cultivo nutritivo PDA (puré de patatas 2%,

glucosa 2%, agar 2%). Las cajas se incubaron a 22 °C durante 4 días para permitir el crecimiento del patógeno y posteriormente se inocularon, en el extremo opuesto de las cajas, 20 μ l de esporas de las distintas cepas de *Trichoderma* a una concentración de 10^5 esporas/ml. Las cajas continuaron incubándose a 22 °C durante 18 días. Como control se inocularon cajas con medio nutritivo PDA con los distintos aislados de *V. dahliae* en las que no se inoculó *Trichoderma*.

Al cabo del tiempo, los hongos entraron en contacto y podían darse dos situaciones distintas: que ambos parasen su crecimiento en la zona de contacto o que uno de ellos provocase una lisis del micelio del otro y acabase creciendo por encima de éste. De hecho, el efecto antagonista se comprobó viendo el sobrecrecimiento de *Trichoderma* y la posible muerte del patógeno al microscopio y por siembra en medio selectivo para el patógeno (crecimiento en presencia de tóxicos en el que *Trichoderma* no podía crecer pero al que el patógeno era resistente).

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

Para analizar cuantitativamente los resultados obtenidos se midió el área de crecimiento de las distintas cepas de *Verticillium* en los diferentes ensayos de enfrentamiento con *Trichoderma*. Los resultados obtenidos se representan en la figura 2 A-I a diferentes tiempos de incubación (3, 6, y 15 días). Se observó que en la mayoría de los casos las cepas de *Trichoderma* empleadas sobrecrecían al patógeno, aunque en algunos casos las cepas sólo consiguieron parar su crecimiento (véase el caso de *T. harzianum* CECT 2413 contra *V. dahliae* 1A-3 y 1A-4).

Por tanto, el análisis de estos resultados mostró un efecto inhibitor del crecimiento, tanto de aislados de *Verticillium* defoliantes como no defoliantes, en el caso de *Trichoderma harzianum* CECT 2413, sola o en combinación con *T. atroviride* IMI 206040, y con una clara tendencia que se hizo patente tras 15 días de incubación.

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

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

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

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

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

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*.

EJEMPLO 2. Ensayos *in vitro* de protección de plantas de olivo frente a la infección por *Verticillium dahliae* mediante el tratamiento con *Trichoderma harzianum* CECT 2413.

Se procedió a realizar ensayos de protección con un número significativo de plántulas de olivo de la variedad picual - variedad susceptible-, con objeto de comprobar la eficacia de las distintas cepas de *Trichoderma* utilizadas en la protección de la infección provocada por el hongo patógeno *V. dahliae*.

Para la realización de estos ensayos se emplearon las cepas de *T. harzianum* CECT 2413 y *T. asperellum* (esta última también denominada "cepa olivo" por ser autóctona de la raíz de esta planta), cepas que presentan un alto antagonismo frente al patógeno y que además se vio que desarrollaban la mayor capacidad de colonización de la raíz del olivo de entre todas las cepas analizadas. También se empleó la combinación de ambas cepas.

Los ensayos se realizaron adicionando una preparación estandarizada de esporas de *Trichoderma* mediante tratamiento por agua de riego, ya que previamente se había visto que no existían diferencias significativas entre este tratamiento y el tratamiento por inmersión en cultivos hidropónicos, y además las plantas así tratadas presentaban una menor manipulación y se asemejaba a las condiciones de cultivo en campo. Para ello, se realizaron cuatro aplicaciones de las distintas preparaciones de *Trichoderma* a una concentración de 10^5 esporas cepa/ml de agua de riego, y un volumen de 35 ml por planta (determinado previamente, y que aseguraba un contacto permanente y sin pérdidas de la disolución de *Trichoderma* con el sustrato sobre el que se añade) durante un periodo de 32 días, y en condiciones experimentales basadas en un fotoperiodo de 12h/12h, intensidad luminosa (luz fluorescente) de $360 \mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, temperatura 22-24°C día/noche y humedad 70-80%.

A continuación, y una vez tratadas las plantas con las distintas cepas de *Trichoderma*, se procedió a realizar la infección con un patotipo defoliante de *V. dahliae* para establecer la capacidad de protección de estas cepas frente al desarrollo de la enfermedad.

Para llevar a cabo esta aproximación experimental, se realizaron los tratamientos que se describen a continuación (n=20 plantas / tratamiento):

- 1) Control (de tratamientos y manipulación),
- 2) Plantas tratadas con *Trichoderma harzianum* CECT 2413 (control, posible influencia de esta cepa de *Trichoderma* sobre la planta, por ejemplo, estimulación del crecimiento vegetal, posibles efectos deletéreos, etc.),
- 3) Plantas tratadas con *Trichoderma asperellum* [cepa de olivo] (control, posible influencia de esta cepa de *Trichoderma* sobre la planta, por ejemplo, estimulación del crecimiento vegetal, posibles efectos deletéreos, etc.),
- 4) Plantas tratadas con *T. harzianum* CECT 2413+*T. asperellum* (control, posible influencia de esta combinación de cepas de *Trichoderma* sobre la planta, por ejemplo, estimulación del crecimiento vegetal, posibles efectos deletéreos, etc.),
- 5) Plantas inoculadas con *V. dahliae* (VCG1A-3, patotipo D) (control de enfermedad),
- 6) Plantas tratadas con *Trichoderma harzianum* CECT 2413 e inoculadas con *V. dahliae* (tratamiento de la enfermedad),
- 7) Plantas tratadas con *Trichoderma asperellum* e inoculadas con *V. dahliae* (tratamiento de la enfermedad), y
- 8) Plantas tratadas con la combinación de *T. harzianum* CECT 2413 y *T. asperellum* e inoculadas con *V. dahliae* (tratamiento de la enfermedad).

Los tratamientos nº1, nº2, nº3 y nº4 permitieron el establecimiento de efectos comparativos entre sí, por ejemplo, posible estimulación del crecimiento vegetal mediada por las cepas de *Trichoderma* (tratamientos nº2, nº3 y nº4) con respecto a la ausencia de las mismas (tratamiento nº1). El tratamiento nº1 sólo recibió las manipulaciones que tuvieron lugar en los otros tratamientos, por ejemplo, aplicación del mismo número de riegos (volumen, vehículo, etc.) que se realizó para los tratamientos con *Trichoderma*, así como las manipulaciones que soportaron las plantas del resto de tratamientos (trasplantes, etc.). En cuanto al tratamiento nº5 fue el referente para el control de enfermedad y los tratamientos nº6, nº7 y nº8 fueron los tratamientos problema para el control de protección de enfermedad.

Para la inoculación artificial del patógeno *V. dahliae* en las plantas de olivo se utilizaron suspensiones de conidias del aislado VCG1A-3 (patotipo D) obtenidas de cultivos en caldo de patata dextrosa (CPD) de 7 días de crecimiento a 24°C, 125 rpm, en oscuridad. Dichos cultivos se establecieron de colonias de *V. dahliae* en PDA de 2-3 semanas de crecimiento a 24°C y oscuridad; tres porciones (~0,5 cm²) tomadas de zonas en crecimiento activo de las colonias se depositaron en matraces con 100 ml de CPD. La suspensión de conidias se obtuvo por filtración de los cultivos líquidos a través de doble gasa estéril. La concentración del inóculo utilizado en los experimentos se ajustó a 5×10^6 conidias·ml⁻¹ mediante recuento microscópico en cámara Neubauer.

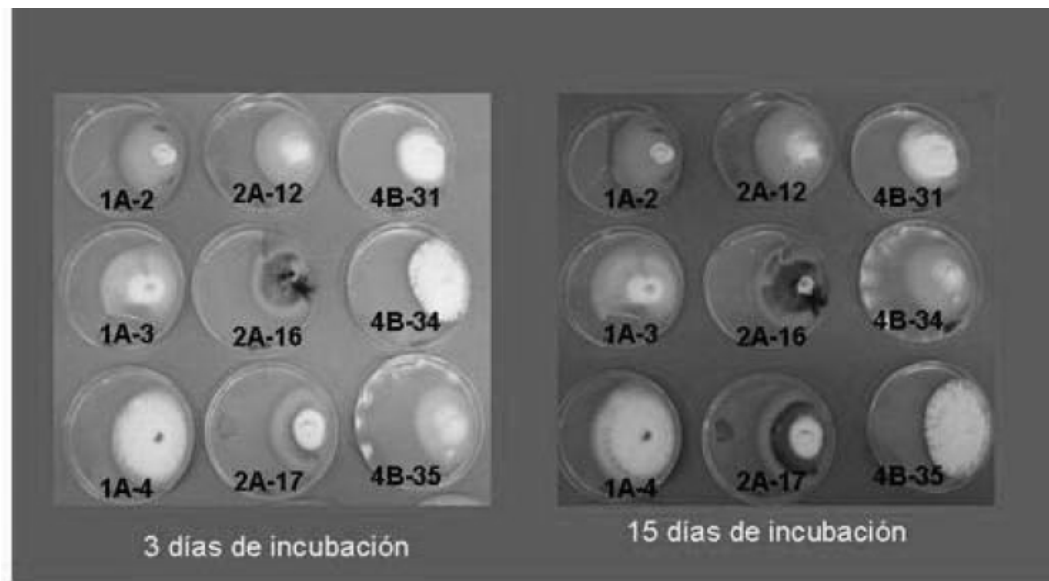
- 5 Se realizaron incisiones con bisturí en las cuatro esquinas de las macetas con objeto de romper el sistema radicular para facilitar la penetración del patógeno y evitar la manipulación directa de la planta. Posteriormente, se procedió a la inoculación de las plantas mediante la adición directa al suelo de 35 ml de la suspensión de conidias. Finalmente, las macetas se dispusieron individualmente sobre placas de petri en las cámaras de cultivo en condiciones controladas de fotoperiodo, intensidad luminosa, temperatura y humedad.
- 10 Se establecieron condiciones de inoculación del patógeno que pueden considerarse relativamente naturales, y similares a las que pueden tener lugar en el cultivar de campo.
- Tras el comienzo de los experimentos se analizó la evolución de las plantas frente al desarrollo de la enfermedad. Se determinó el número total de hojas como índice de defoliación, tanto de tallo principal como secundarios, y se aplicó una escala de severidad de daño al objeto de establecer la sintomatología del desarrollo de la enfermedad.
- 15 Los resultados no mostraron diferencias significativas entre el control de manipulación (tratamiento nº1) y las plantas pretratadas con cepas de *T. harzianum* CECT 2413, *T. asperellum* y la mezcla de ambas cepas de *Trichoderma* (tratamientos nº2, nº3 y nº4). Sin embargo, la inoculación con *V. dahliae* 1A-3 originó una disminución significativa en el número total de hojas a partir del día 58 de tratamiento, en las plantas tratadas previamente con *T. asperellum* o con la mezcla de ambas cepas de *Trichoderma*, que fue del 33% y 24,5%, respectivamente. Mientras que en las plantas pretratadas con *T. harzianum* CECT 2413, el patógeno no produjo cambios significativos en el número total de hojas durante los 91 días de tratamiento (Fig. 6).
- 20 En este sentido, al realizar el análisis de la escala de severidad del daño a partir de la sintomatología observada a lo largo del tiempo, tanto en plantas control sometidas a la enfermedad como en plantas tratadas previamente con *T. asperellum* y con la mezcla de *T. asperellum* y *T. harzianum* CECT 2413 e inoculadas con *V. dahliae* se apreció un incremento significativo del daño, sin que se apreciaran modificaciones significativas en las plantas pretratadas con *T. harzianum* CECT 2413 e inoculadas con *V. dahliae* a lo largo del tiempo (Fig. 7).
- 25 El comportamiento observado tras el análisis de los resultados del ensayo anteriormente descrito de inoculación por riego en plantas dañadas mediante lesiones en raíces por cortes en suelo, sugiere la existencia de protección frente a la enfermedad del 100% en el caso del pretratamiento de las plantas con *Trichoderma harzianum* CECT 2413, del 45% en el caso del pretratamiento con *Trichoderma asperellum* y del 60% en el caso del pretratamiento de las plantas con la mezcla de ambas cepas de *Trichoderma*. Estos resultados perfilan la tendencia al control de la enfermedad para las plantas pretratadas con *Trichoderma harzianum* CECT 2413, estableciendo además que desarrolla un efecto de protección superior al observado para *Trichoderma asperellum* y la mezcla de ambas cepas.

30

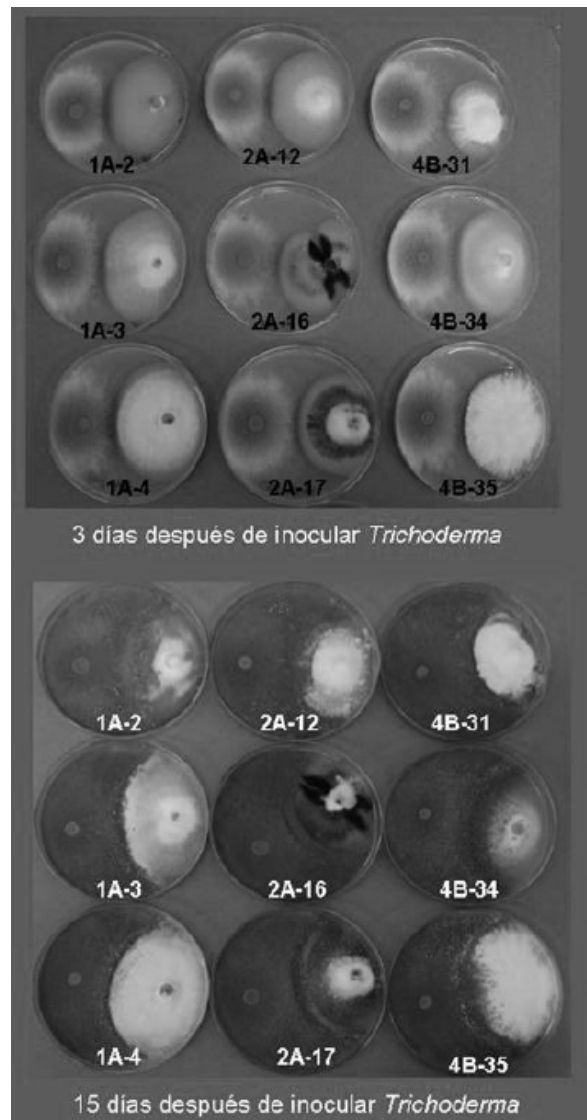
REIVINDICACIONES

1. Uso de la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413 y/o de los productos de su metabolismo para la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*.
- 5 2. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según la reivindicación 1 donde el hongo fitopatógeno es *Verticillium dahliae*.
3. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde la planta afectada por el hongo fitopatógeno se selecciona de la lista que comprende: alcachofa, algodón, melón, tomate, patata u olivo.
4. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según la reivindicación 3 donde la planta es el olivo.
- 10 5. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en combinación con al menos una cepa de *Trichoderma* seleccionada de la lista que comprende: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 20756, *Trichoderma harzianum* PF1 o *Trichoderma atroviride* IMI 206040.
- 15 6. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según la reivindicación 5 en combinación con las cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 20756, *Trichoderma harzianum* PF1 y *Trichoderma atroviride* IMI 206040.
7. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde las cepas de *Trichoderma* se encuentran en estado esporulado.
- 20 8. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en combinación con productos del metabolismo de al menos una cepa de *Trichoderma* seleccionada de la lista que comprende: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 20756, *Trichoderma harzianum* PF1 o *Trichoderma atroviride* IMI 206040.
- 25 9. Uso de la cepa y/o de los productos de su metabolismo según la reivindicación 8 en combinación con productos del metabolismo de las cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma atroviride* CECT 20755, *Trichoderma harzianum* CECT 20756, *Trichoderma harzianum* PF1 y *Trichoderma atroviride* IMI 206040.

A



B



C

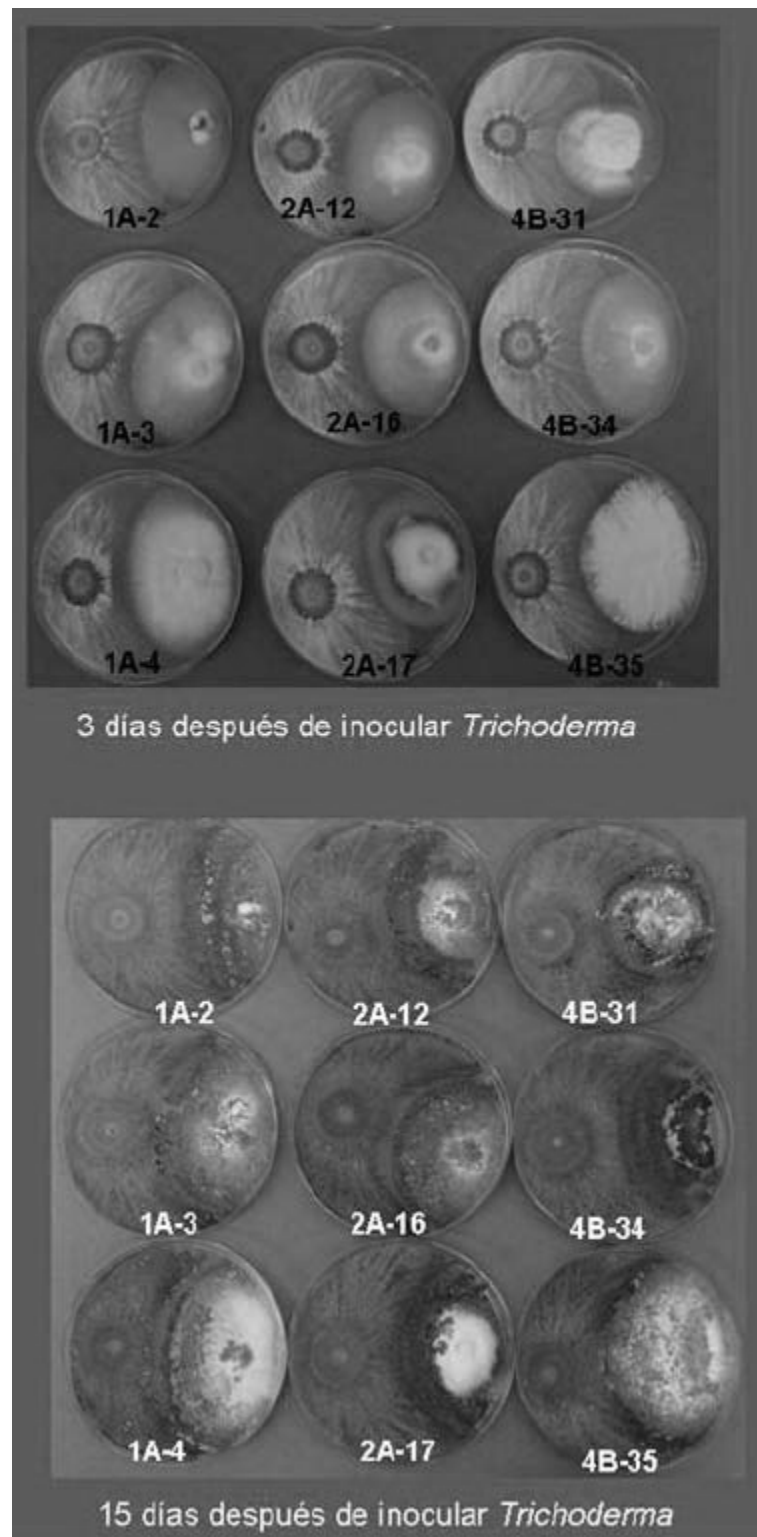
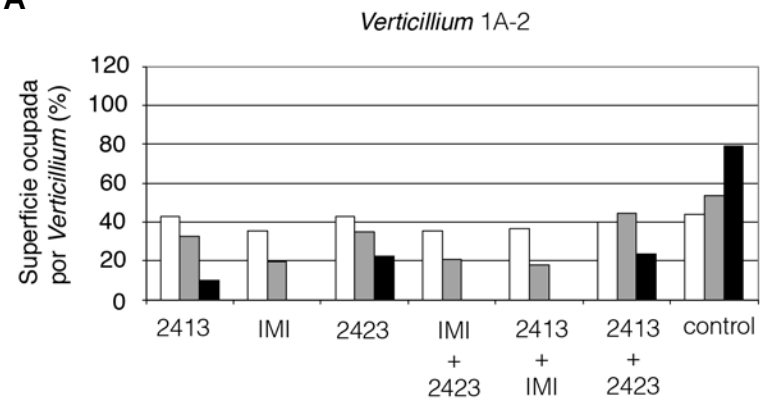
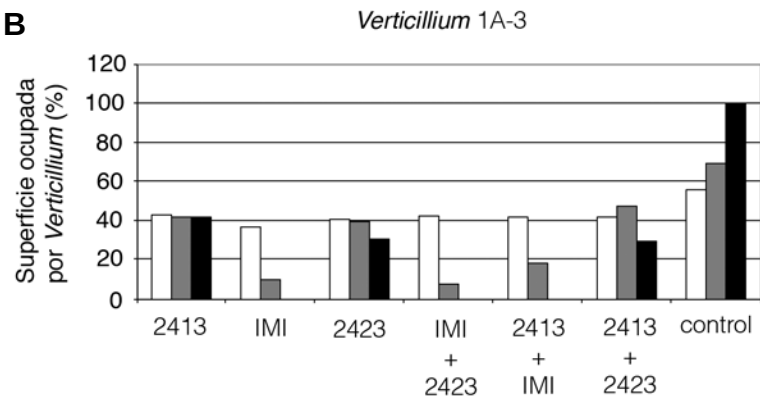


Fig. 1

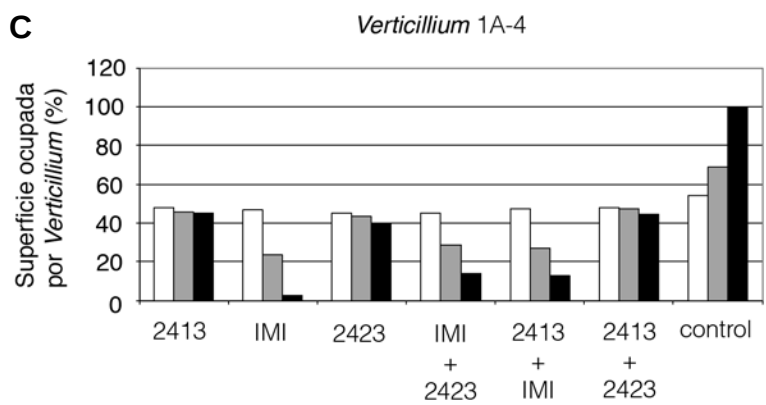
A



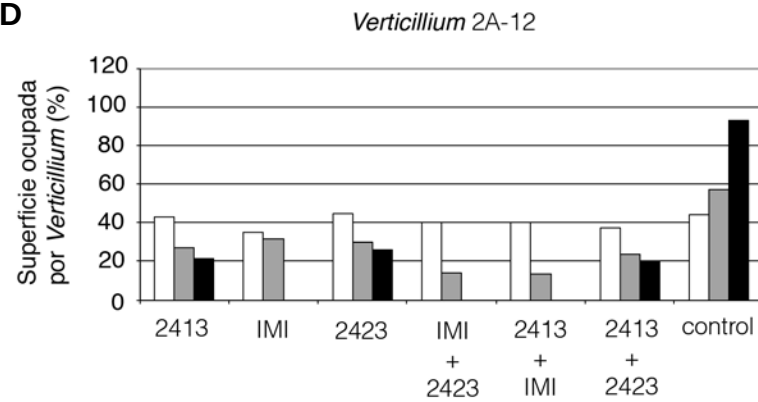
B



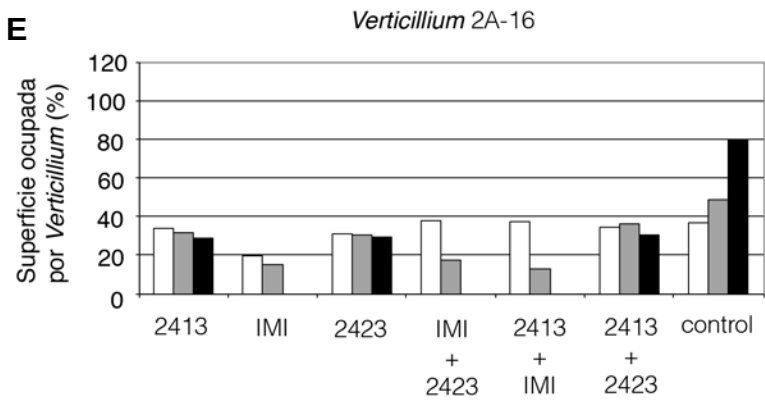
C



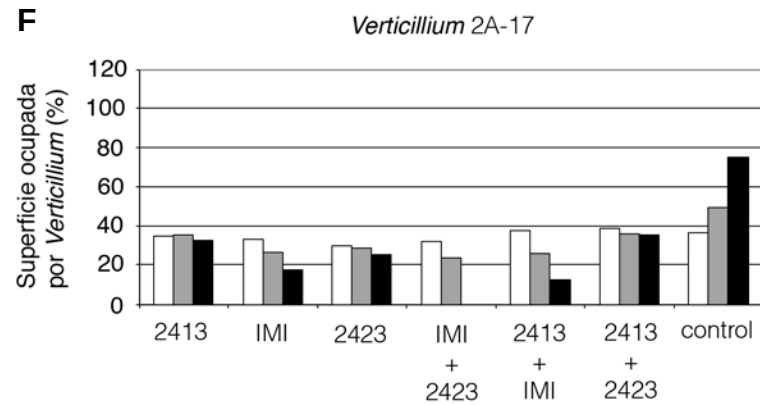
D



E



F



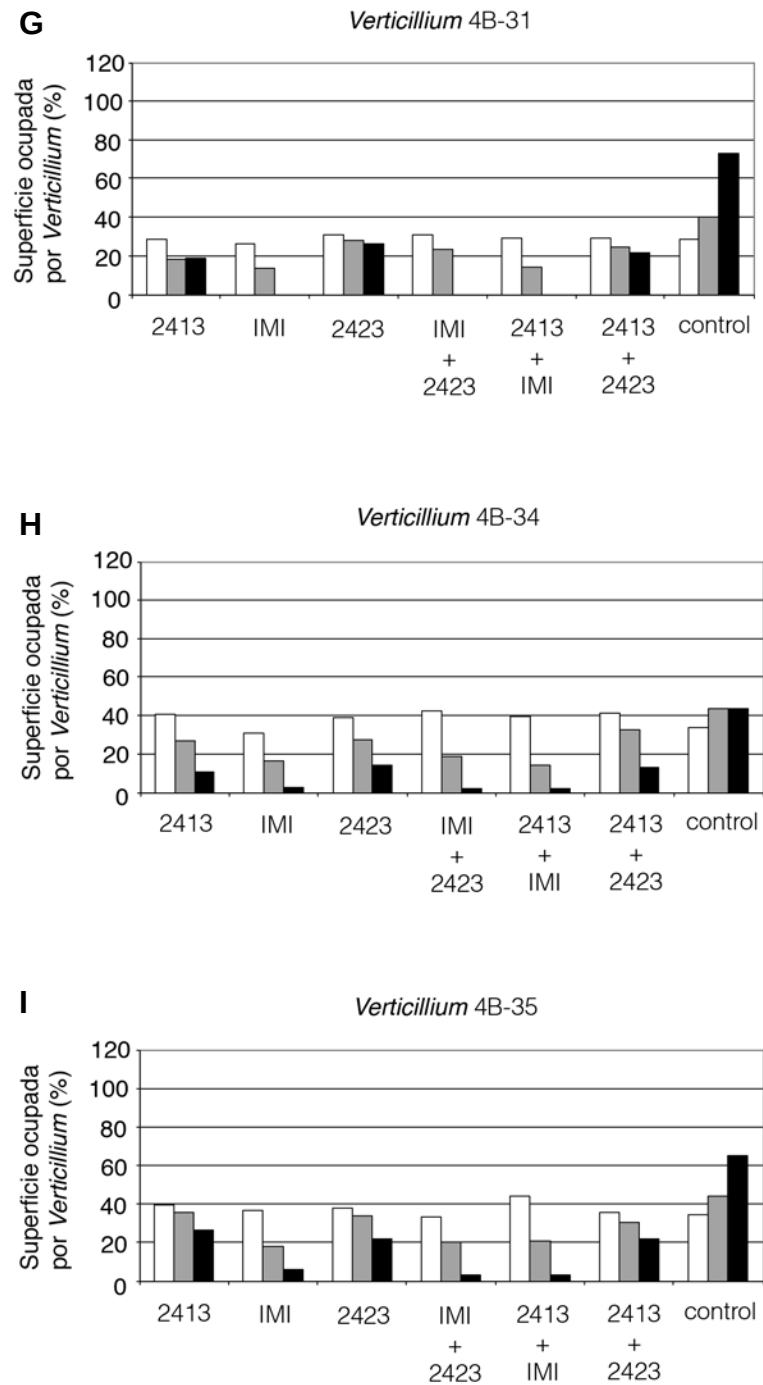


Fig. 2

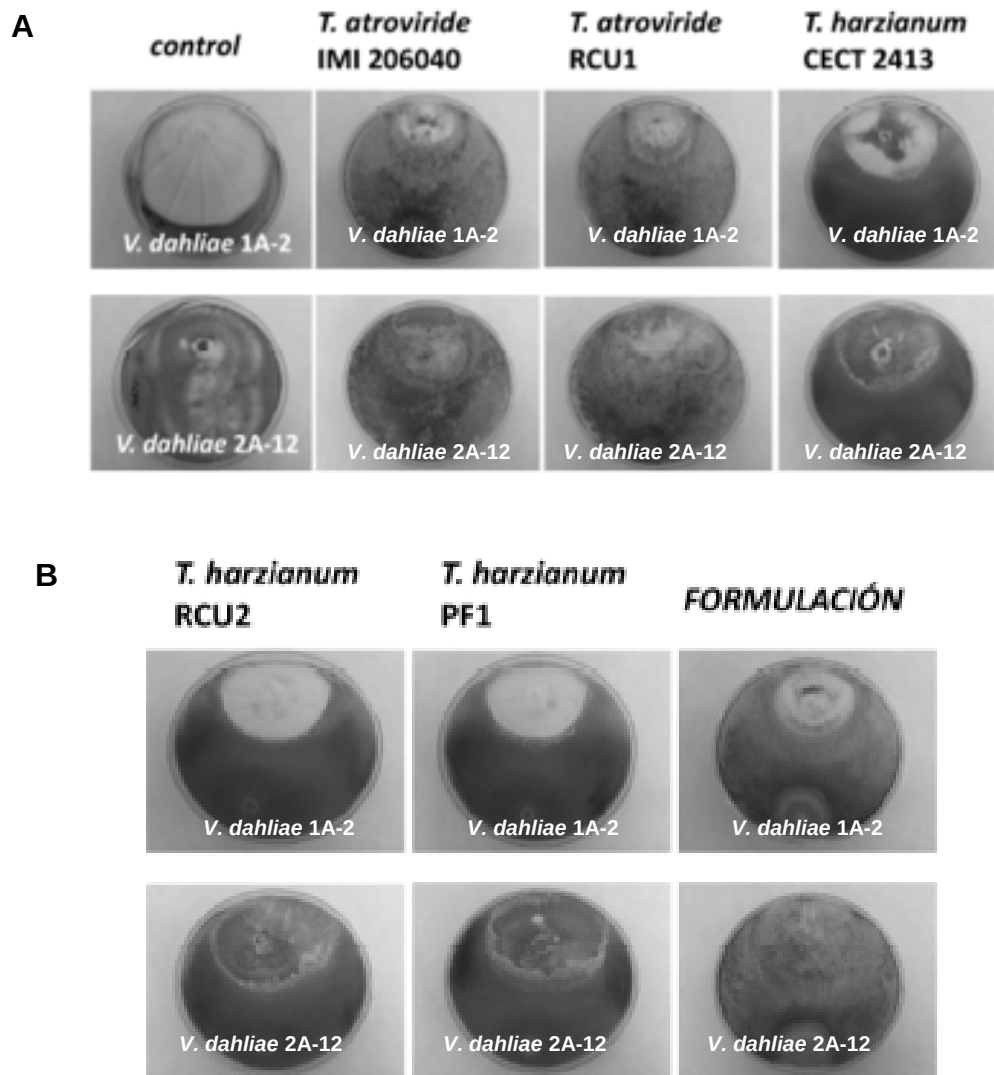


Fig. 3

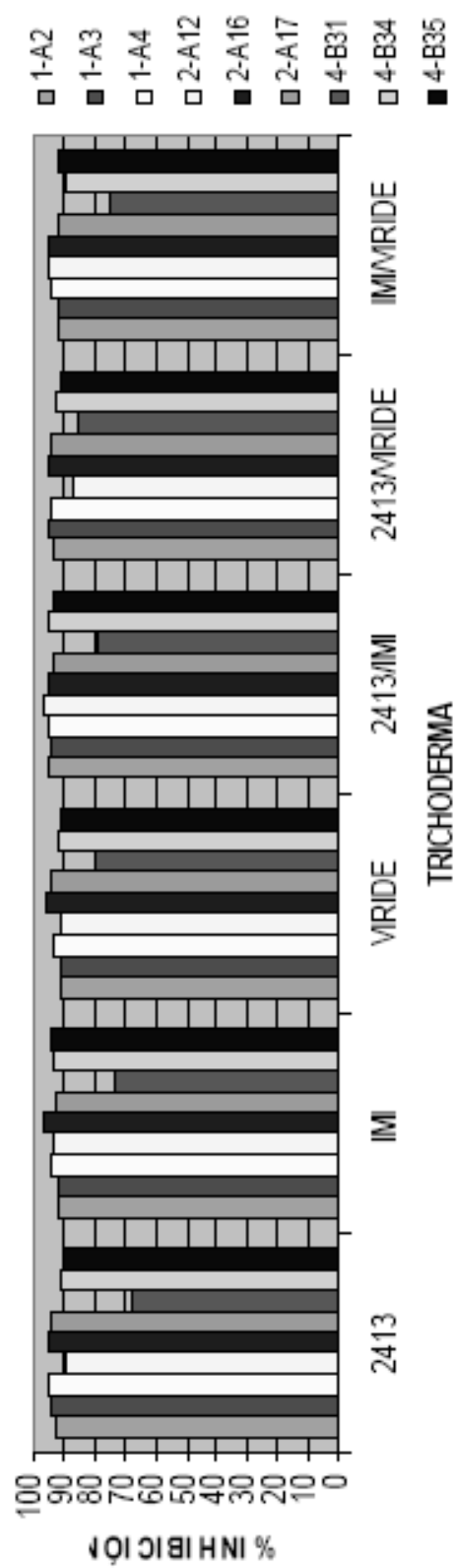


FIG. 4

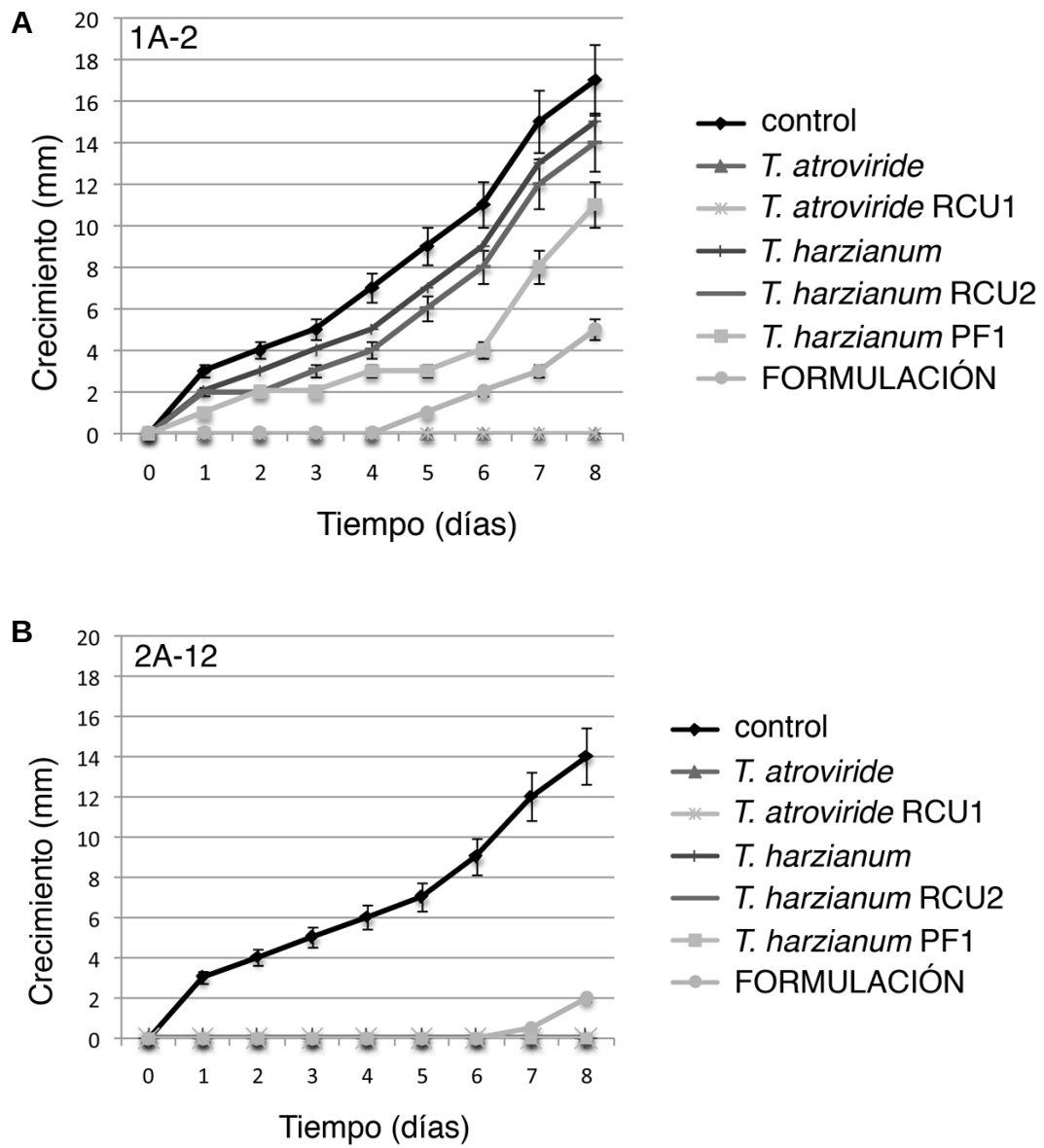


FIG. 5

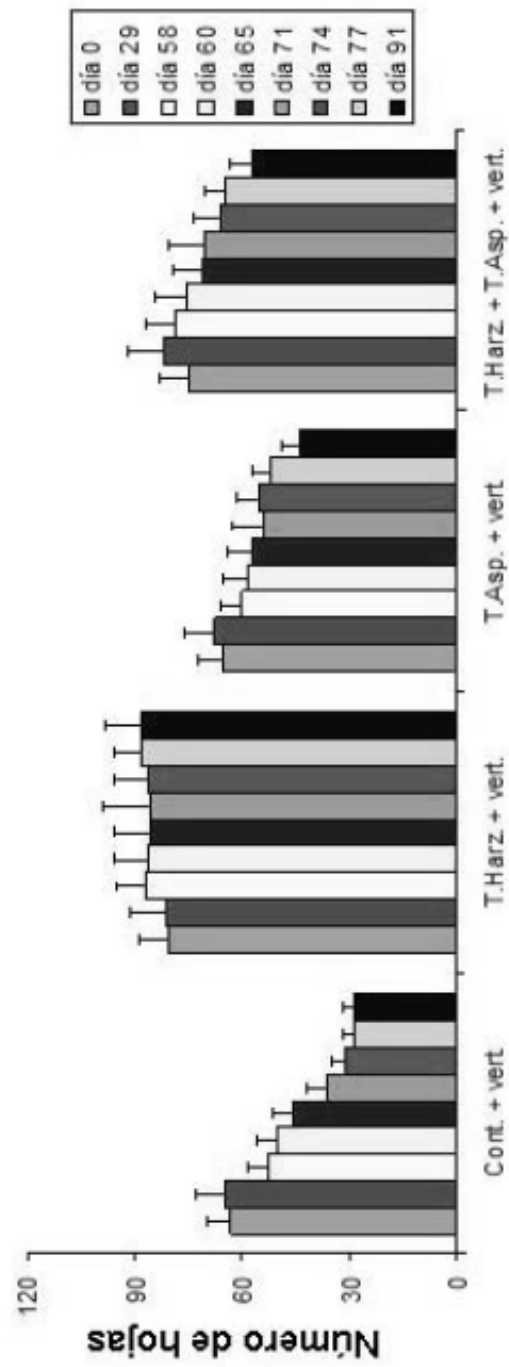


Fig. 6

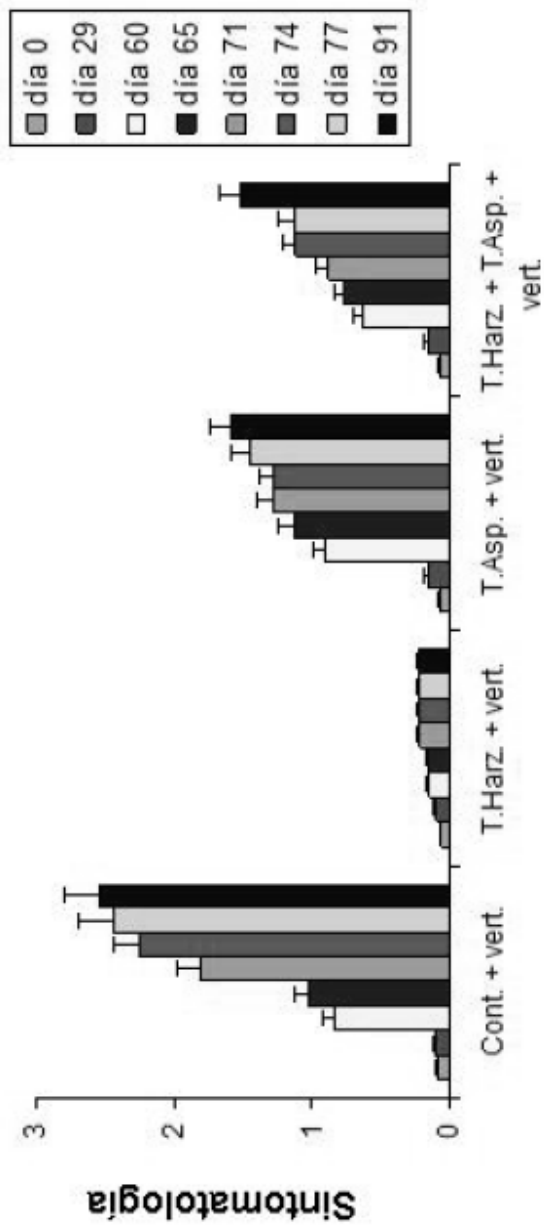


Fig. 7



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130609

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
Y	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	1-5,7-9
A		6
Y	FLAMINI et al., "Biocontrol of <i>Verticillium dahlia</i> isolated from olive trees by <i>Trichoderma</i> spp" <i>Journal of Plant Pathology</i> (2005), vol. 87, nº 4, Spacialissue, pág. 267-309, todo el documento.	1-5,7-9
A		6
Y	ORDENTLICH A, et al., "Integrated control of <i>Verticillium-dahliae</i> in potato by <i>Trichoderma-harzianum</i> and captan" <i>Crop Protection</i> (1990), vol. 9, nº 5, pág - 363-366, todo el documento.	1-5,7-9
A		6
A	WO 2009083819 A1 (SIMBIYOTEC BIYOLOGIC URUNLER SANAYI) 09.07.2009, todo el documento.	1-9
A	TARUS PK. et al, "Fermentation and antimicrobial activities of extracts from different species of fungus belonging to Genus, <i>Trichoderma</i> ", <i>Afr J Health Sci.</i> (2004); 11(1-2): pág.33-42, todo el documento.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.11.2012

Examinador
M. Hernández 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, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.11.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 6	SI
	Reivindicaciones 1-5, 7-9	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	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	
D02	FLAMINI et al., "Biocontrol of <i>Verticillium dahliae</i> isolated from olive trees by <i>Trichoderma</i> spp" <i>Journal of Plant Pathology</i> (2005), vol. 87, nº 4, Specialissue, pág. 267-309, todo el documento	
D03	ORDENTLICH A, et al., "Integrated control of <i>Verticillium-dahliae</i> in potato by <i>Trichoderma-harzianum</i> and captan" <i>Crop Protection</i> (1990), vol. 9, nº 5, pág - 363-366, todo el documento.	

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

La presente invención se refiere al uso de la cepa de hongos *Trichoderma harzianum* CECT 2413 para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, más preferiblemente por *Verticillium dahliae*, preferiblemente por los patotipos defoliante o no defoliante de *Verticillium dahliae*, agente causante de la verticilosis del olivo. Además, la invención propone el uso de esta cepa de hongos en combinación con otros hongos del género *Trichoderma*.

El documento D01 describe la actividad antifúngica de la cepa *Trichoderma harzianum* CECT 2413 frente a infecciones causadas por *Rhizotocnia solani* y *Botrytis cinérea*.

El documento D02 describe la actividad antifúngica de *Trichoderma harzianum* sobre *Verticillium dahliae* aislado de olivos.

El documento D03 describe la obtención de buenos resultados obtenidos con el tratamiento de granulos de *Trichoderma harzianum* sobre patatas infectadas con *Verticillium dahliae*

1.- NOVEDAD

A la vista de los documentos citados en el estado de la técnica, las reivindicaciones 1-4 relativas al uso de la cepa de hongos *Trichoderma harzianum* CECT 2413 para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*, son nuevas de acuerdo al Art. 6.1 LP. También se consideran nuevas las reivindicaciones 5-9 relativas al uso de las diferentes combinaciones de CECT 2413 con las cepas de *Trichoderma* indicadas.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

Las reivindicaciones 1-4 y 7 se refieren al uso de la cepa de hongos *Trichoderma harzianum* CECT 2413 para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas y/o suelos provocadas por hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Verticillium*. El documento D02 describe la actividad antifúngica de *Trichoderma harzianum* sobre *Verticillium dahliae* aislado de olivos. El experto en la materia interesado en la curación de la verticilosis en olivo estaría motivado poner en práctica la información aportada en dicho documento. Además el documento D03 describe el éxito del tratamiento de patatas infectadas con *Verticillium dahliae* con granulos de *Trichoderma harzianum*. En este sentido parece que el experto en la materia tendría unas expectativas razonables de éxito al usar la cepa CECT 2413 para el tratamiento de olivos infectados con *Verticillium dahliae*. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-4 y 7 carecen del requisito de actividad inventiva según el Art. 8.1

En cuanto a las reivindicaciones 5-6 y 8-9 relativas a diferentes combinaciones de CECT 2413 con otras cepas de *Trichoderma* o los productos de su metabolismo es de aplicación el anterior razonamiento y por tanto se puede concluir que el experto en la materia estaría motivado a combinar distintas cepas de *Trichoderma* y obtener unas expectativas razonables de éxito en el tratamiento de la verticilosis del olivo. En este sentido en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 5 y 8-9 no cumplen el requisito de actividad inventiva según el Art. 8.1. De acuerdo a los ejemplos de la solicitud, la única combinación para la que se aportan datos y muestra una capacidad antifúngica mejorada con respecto a las cepas de *Trichoderma harzianum* por separado es la contenida en la reivindicación 6. En este sentido, en opinión de esta Oficina la reivindicación 6 cumple el requisito de actividad inventiva según el Art. 8.1