



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 188 385**

② Número de solicitud: 200101552

⑤ Int. Cl.7: **C12N 1/14**
A01N 63/04
C05F 11/08
// (C12N 1/14
C12R 1:885)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **26.06.2001**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2003**

Fecha de la concesión: **19.10.2004**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.12.2004**

⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.12.2004

⑦ Titular/es: **Universidad de Barcelona
Centre de Patents, Baldiri Reixac, 4
08028 Barcelona, ES**

⑦ Inventor/es: **Trillas Gay, María Isabel y
Cotxarrera Vilaplana, María Lurdes**

⑦ Agente: **Segura Cámara, Pascual**

⑤ Título: **Sustratos para el control biológico de enfermedades de plantas.**

⑤ Resumen:

Sustratos para el control biológico de enfermedades de plantas.

Trichoderma asperellum cepa T34 (2) CECT No. 20417 es útil para la preparación de sustratos para el control biológico de la fusariosis vascular y de la muerte de plántulas causada por *Rhizoctonia solani*. Los sustratos pueden ser turbas, composts (compost de madera dura, de corteza de pino, de corcho, de fangos de depuradora, de residuos de jardinería, etc.) o formulaciones a base de compost del tipo CPV (compost + turba + vermiculita). El hecho que estos sustratos sean supresores a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y a *Rhizoctonia solani* a la vez, representa una ventaja comparado con otros sustratos conocidos en la técnica. Otra ventaja es que, en el control de la fusariosis vascular, se evita el uso de bromuro de metilo, producto altamente nocivo para el medio ambiente.

ES 2 188 385 B1

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

DESCRIPCION

Sustratos para el control biológico de enfermedades de plantas.

Esta invención trata de sustratos supresores (por ejemplo composts o turbas) para el control de enfermedades o para el crecimiento de plantas, en los cuales se introduce un microorganismo antagonista a patógenos de plantas.

Estado de la técnica previo

Un sustrato es una mezcla de diversos materiales que se pueden utilizar para el crecimiento de plantas. Un sustrato (también denominado medio de crecimiento de plantas; y en inglés: "container medium", "potting mix", "potting soil", etc.) generalmente comprende uno o más agregados ligeros neutros (arena de sílice, perlita, vermiculita, poliestireno expandido, etc.) y un constituyente orgánico (turba de Sphagnum, compost, etc.), opcionalmente con suelo. En la formulación de sustratos las proporciones utilizadas de los ingredientes antes mencionados pueden variar ampliamente, según el tamaño de la maceta, el sistema de riego y su utilización última.

Los composts preparados a partir de residuos heterogéneos y utilizados como sustratos pueden, de manera natural, ser supresores contra varias enfermedades producidas por patógenos del suelo, o pueden convertirse en supresores con la adición de microorganismos antagonistas. Este efecto supresor puede ser altamente variable. Los composts y los sustratos formulados a base de compost normalmente son más supresores que las turbas de Sphagnum debido a la comunidad microbiológica que sustentan, y a su actividad. Los composts pueden proporcionar fuentes de energía para una gran diversidad de microorganismos y facilitar así el control biológico de los patógenos de las plantas. Sin embargo, cuando se utiliza turba de Sphagnum como único componente orgánico en un sustrato, este medio es una fuente pobre de energía y habitualmente no permite el control de las enfermedades de las plantas.

Dos enfermedades frecuentes en las plantas son las marchiteces y las muertes de plántulas causadas por hongos (*Fusarium oxysporum*, *Verticillium* spp., *Rhizoctonia solani*). Las marchiteces producidas por *Fusarium* (fusariosis vascular, en lo que sigue) son enfermedades causadas por varias f. sp. (*forma specialis*, formas especiales) y razas de *Fusarium oxysporum*. La fusariosis vascular produce importantes pérdidas en muchos cultivos, sobretodo en regiones de temperaturas elevadas, y es difícil de controlar mediante el uso de productos químicos (a menudo debe utilizarse el bromuro de metilo, altamente contaminante). La muerte de plántulas causada por *Rhizoctonia solani* es una de las enfermedades de plántulas más importante en el mundo. Algunos microorganismos antagonistas específicos, especialmente dentro de los géneros *Pseudomonas* y *Trichoderma*, se han utilizado para la supresión de las enfermedades citadas anteriormente. Sin embargo, en la práctica se ha demostrado que es muy difícil asegurar que estos microorganismos antagonistas se encuentren en el sustrato en unas densidades suficientes para conseguir un control efectivo de las enfermedades de las plantas. Con-

secuentemente, para conseguir un sustrato supresor con fines agrícolas, hay la necesidad de nuevos métodos para producir o asegurar poblaciones suficientes de los microorganismos deseados.

En este sentido, es muy adecuada la inoculación artificial de sustratos con microorganismos antagonistas, formulados a ser posible a base de compost. Finalmente, debido a las importantes pérdidas causadas por *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* en diversos cultivos comerciales, es muy deseable un método reproducible para obtener sustratos que sean supresores a ambos patógenos.

Se conocen algunos intentos para controlar biológicamente enfermedades de plantas en los que se usa *Trichoderma* spp. Así, por ejemplo, US 4.900.348 describe un método para producir un sustrato supresor a enfermedades causadas por *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum* que utiliza una mezcla de *Trichoderma hamatum* cepa 382 y *Flavobacterium balustinum* cepa 299. US 4.642.131 describe un método en el que *Trichoderma hamatum* se usa en combinación con bacterias. Sin embargo, ninguno de estos métodos permite el control de la fusariosis vascular, lo cual supone una limitación importante, ya que en la práctica esta enfermedad ha de ser controlada principalmente con bromuro de metilo, un producto químico altamente peligroso, que causa serios problemas ambientales.

Explicación de la invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un cultivo biológicamente puro del hongo *Trichoderma asperellum* cepa T34(2) para inducir supresión de enfermedades de plantas causadas por *Rhizoctonia solani* y/o *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. La cepa T34(2) de *Trichoderma asperellum* fue depositada, el 28 de marzo de 2001, en la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, 46100 Burjassot, Valencia, España) con CECT No. 20417, según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Fines del Procedimiento de Patente.

El antagonista *Trichoderma asperellum* cepa T34(2) se aisló de un sustrato supresor formulado a base de compost (CPV; compost: turba: vermiculita; 2:1:1 v/v), preparado a partir de la fracción orgánica de residuo de mercados, fangos de depuradora y restos de jardinería. Compost de corcho (CC), turba de Sphagnum (P) y CPV se inocularon con una suspensión de conidias de un cultivo puro de esta cepa, y se ensayó su capacidad para controlar la fusariosis vascular y la muerte de plántulas causada por *Rhizoctonia solani*. El compost de corcho natural y la turba de Sphagnum tratada térmicamente, inoculados con *Trichoderma asperellum* cepa T34(2) controlan la muerte de plántulas de pepino causada por *Rhizoctonia solani*. El sustrato CPV esterilizado, inoculado con *Trichoderma asperellum* cepa 34(2) controla la fusariosis vascular del tomate.

Otro aspecto de la presente invención hace referencia a un método para producir un sustrato supresor a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Rhizoctonia solani* o las enfermedades causadas por ellos, que comprende la inoculación de

Trichoderma asperellum cepa T34(2) CECT No. 20417 en el sustrato.

Los materiales utilizados para producir sustratos supresores de acuerdo con el método de la presente invención, pueden ser seleccionados entre los que se usan habitualmente en el cultivo de plantas. En realizaciones particulares los sustratos son turbas, como por ejemplo la turba de Sphagnum. En otras realizaciones, los sustratos son composts, preferiblemente los obtenidos de madera dura, de corteza de pino, de corcho, de fangos de depuradora y/o de residuos de jardinería. Se prefieren particularmente como sustratos los formulados a base de compost del tipo CPV (compost + turba + vermiculita).

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de *Trichoderma asperellum* cepa T34(2), como agente de control biológico de la fusariosis vascular. En comparación con el uso actual del bromuro de metilo para el tratamiento de esta marchitez, la presente invención tiene la ventaja de ser menos nociva para el medio ambiente.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de *Trichoderma asperellum* cepa T34(2) como agente de control biológico de la muerte de plántulas causada por *Rhizoctonia solani*, un problema de gran importancia económica.

Una ventaja importante de los sustratos supresores de esta invención, comparados con los sustratos conocidos en la técnica, es que son supresores tanto a la fusariosis vascular como a la muerte de plántulas causada por *Rhizoctonia solani*, y no sólo a una de ellas. Esto es ventajoso desde el punto de vista de la simplicidad y de la economía.

Descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico de barras de la incidencia de la enfermedad (1), expresada como porcentaje (%), correspondiente a la muerte, causada por *Rhizoctonia solani*, de plántulas de pepino variedad "Negrito", cultivados en compost de corcho (CC) o en turba de Sphagnum (P), tratados térmicamente a 60°C (CC-60 y P-60) o no tratados (a 25°C: CC-25, P-25), e inoculados o no inoculados con el antagonista *Trichoderma asperellum* cepa T34(2). Los resultados obtenidos para los tratamientos control (sustratos no inoculados con el patógeno) se muestran como: barra blanca en los sustratos no inoculados con T34(2); barra negra en los sustratos inoculados con T34(2). Los resultados obtenidos para los tratamientos inoculados con el patógeno, se muestran como: barra a cuadros en sustratos no inoculados con T34(2); barra a rayas en sustratos inoculados con T34(2). La incidencia de la enfermedad va de 0% (todas las plantas asintomáticas) a 100% (todas las plantas sintomáticas). Cada barra representa el promedio de quince macetas, cada una conteniendo quince plantas. Cada experimento se repitió como mínimo tres veces.

Las Figs. 2 y 3 son gráficos de la incidencia de la enfermedad (I), expresada como porcentaje (%), correspondiente al progreso a lo largo del tiempo (t, en días) de la fusariosis vascular en plantas de tomate de la variedad "Roma" cultivadas en el sustrato CPV natural (círculos blancos), esterilizado (círculos negros) o esterilizado e inoculado con *Trichoderma asperellum* cepa T34(2)

(triángulos). Los sustratos fueron infestados con *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 1 en la concentración de 10⁴ (Fig. 2) o 10⁵ (Fig. 3) unidades formadoras de colonias (cfu, colony forming units, en inglés) por mililitro de sustrato. La incidencia de la enfermedad va de 0% (todas las plantas asintomáticas) a 100% (todas las plantas sintomáticas). Cada curva representa el promedio de como mínimo cinco macetas cada una conteniendo cuatro plantas.

Descripción detallada de la invención

1. Aislamiento y caracterización de la cepa de *Trichoderma asperellum*

El método utilizado para el aislamiento de *Trichoderma* spp. fue la suspensión-dilución en Patata-Dextrosa-Agar modificado (PDA más clorotetraciclina, 50 mg/l, y tergitol NP-10, 1 ml/l). Las colonias de *Trichoderma* spp. se identificaron por microscopía óptica utilizando las claves de Rifai (cf. M.A. Rifai, "A revision of the genus *Trichoderma*. Commonwealth Mycological Institute", *Mycological papers* 1969, no. 116, págs. 1-56) y se obtuvieron cultivos monospóricos de esta cepa. La identificación de la cepa T34(2) como *Trichoderma asperellum* se realizó por secuenciación de la región ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1, en inglés) adyacente al gen 5.8S rRNA (M.R. Hermosa et al., "Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp.", *Applied and Environmental Microbiology* 2000, vol. 66, págs. 1890-1898). El número de acceso a la secuencia ITS1 de esta cepa es AJ278564 (EMBL Nucleotide Sequence Database).

2. Bioensayo para evaluar la capacidad de supresión de la muerte de plántulas causada por *Rhizoctonia solani*

La cepa AC-4 de *Rhizoctonia solani* originalmente aislada de melón (proporcionada por el Dr. Tello, Universidad de Almería) se hizo crecer en Patata-Dextrosa-Agar (PDA). Se obtuvo un inóculo de este patógeno en una mezcla de patata/suelo secada al aire (fragmentos de 1,0 mm) tal y como se describe (E.B. Nelson et al., "Factors affecting suppression of *Rhizoctonia solani* in container media", *Phytopathology* 1982, vol. 72, págs. 275-279). Para determinar la capacidad de T34(2) de controlar la muerte de plántulas causada por *Rhizoctonia solani*, se inoculó compost de corcho (CC) y turba de Sphagnum (P), natural o tratado térmicamente (60°C, 6 días) con una suspensión de conidias de T34(2) a una concentración final de 1000 cfu/ml de sustrato. El sustrato inoculado se incubó a temperatura ambiente durante quince días para conseguir la colonización del mismo por el agente de control biológico. Como controles positivos se introdujeron el compost de corcho (CC) y la turba de Sphagnum (P) no inoculados con T34(2). Después de la incubación se infestó el sustrato con el inóculo patata/suelo de *Rhizoctonia solani* en una proporción de 1,5 g por cada 2 l de sustrato. Se introdujeron como controles negativos el compost de corcho (CC) y la turba de Sphagnum (P) no inoculadas con el patógeno. Los sustratos se distribuyeron en macetas (macetas de 9 cm, 330 ml de volumen, cinco macetas por tratamiento). Se

plantaron en cada maceta quince semillas de pepino variedad "Negrito" y se cubrieron con 1,0 cm de sustrato. Las macetas se distribuyeron aleatoriamente en una cámara de cultivo ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 h luz y $150\text{-}210 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ de radiación fotosintéticamente activa), se irrigaron con una solución nutritiva completa, durante el bioensayo (7 días). La incidencia de la enfermedad fue medida al final del bioensayo como el porcentaje de plantas sintomáticas por maceta. Todos los experimentos se repitieron como mínimo tres veces.

La Fig. 1 muestra los resultados obtenidos con el compost de corcho (CC) y la turba de Sphagnum (P). El compost de corcho natural es un sustrato moderadamente supresor a la muerte de plántulas causada por *Rhizoctonia solani* (incidencia de enfermedad 55 %) comparado con la turba natural (incidencia de enfermedad 88 %). El tratamiento térmico del compost de corcho (CC) y la turba de Sphagnum (P) causaron la pérdida por completo de la supresividad de los sustratos. La cepa de *Trichoderma asperellum* T34(2) aumentó consistentemente ($P \leq 0,05$) la capacidad de controlar la muerte de los plántulas de pepino causada por *Rhizoctonia solani* en el compost de corcho natural (CC) y de la turba de Sphagnum (P) tratada térmicamente. La inoculación de T34(2) en el compost de corcho (CC) natural redujo la incidencia de la enfermedad en un 30 % en comparación con el corcho natural no inoculado con T34(2). La inoculación de la turba de Sphagnum (P) tratada térmicamente con T34(2) redujo en un 50 % la incidencia de la enfermedad en comparación con la turba (P) no inoculada. Los resultados presentados en este gráfico muestran que T34(2) puede ser efectivo para el control de la muerte de los plántulas causada por *Rhizoctonia solani*, si se inocula en el sustrato adecuado.

3. Bioensayo para evaluar la capacidad de supresión de la fusariosis vascular

La cepa RAF 70 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 (FOL), facilitada desde la Universidad de Almería por el Dr. Tello, se hizo crecer en extracto de malta líquido durante 5 días a 25°C , en un agitador rotatorio. Las conidias se recuperaron de este cultivo líquido por centrifugación (6000 g, 20 min), se lavaron dos veces y se resuspendieron en agua destilada estéril. La suspensión de conidias se mezcló con talco estéril (1/3 suspensión de conidias, 2/3 talco, v/p), se secó en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar, se cribó (200 μm) y almacenó a 4°C . La concentración del inóculo de talco se determinó finalmente por la técnica de suspensión-

dilución en Patata-Dextrosa-Agar (PDA, Sigma-Aldrich).

El compost preparado a partir de la fracción orgánica de residuos de mercado, fangos de depuradora y residuos de jardinería se mezcló con turba de Sphagnum y vermiculita en una proporción de 2:1:1 (v/v) para obtener un sustrato formulado a base de compost (CPV). Esta mezcla fue almacenada a temperatura ambiente (CPV natural), esterilizada (1 h , 120°C) tres días consecutivos (CPV esterilizado) o esterilizada y post-inoculada con una suspensión de conidias de T34(2) a una concentración final de 1000 unidades formadoras de colonias por centímetro cúbico de mezcla. La mezcla esterilizada inoculada con T34(2) se incubó quince días para conseguir la colonización por el agente de control biológico. Los sustratos se infestaron con el inóculo de FOL en talco en las concentraciones de 10^4 o 10^5 cfu/ml de sustrato, y se distribuyeron en macetas (macetas de 9 cm, 330 ml de volumen, cinco macetas por tratamiento). Los sustratos no infestados con el patógeno se introdujeron como controles negativos. Se plantaron cuatro plántulas de tomate variedad "Roma" por maceta. Las macetas se colocaron en una cámara de cultivo ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 h luz y $150\text{-}210 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ de radiación fotosintéticamente activa) y se irrigaron con una solución nutritiva completa. La incidencia de la enfermedad se midió como el porcentaje de plantas sintomáticas a partir de la aparición del primer síntoma de fusariosis vascular.

Las Figs. 2 y 3 muestran los resultados obtenidos con el sustrato formulado a base de compost. El CPV esterilizado inoculado con la cepa de *Trichoderma asperellum* T34(2) resultó ser altamente supresor a la fusariosis vascular del tomate. Concentraciones de patógeno de 10^4 y 10^5 cfu/ml en este sustrato sólo causaron una incidencia de la enfermedad del 10 % (Fig. 2) y del 12 % (Fig. 3), mientras que en el sustrato natural concentraciones de patógeno equivalentes causaron incidencias del 20 % y 55 % respectivamente, después de 30 días de bioensayo. En el sustrato esterilizado no inoculado con T34(2) la incidencia de la enfermedad llegó al 90 % para las dos concentraciones de patógeno ensayadas. En resumen, los resultados presentados en estas gráficas muestran que T34(2) inoculado en el sustrato esterilizado formulado a base de compost incrementó significativamente la capacidad de este sustrato para controlar la fusariosis vascular (a 10^5 cfu/ml) comparado con el mismo sustrato no inoculado con T34(2).

REIVINDICACIONES

1. Cultivo biológicamente puro de *Trichoderma asperellum* cepa T34(2) CECT No. 20417.

2. Composición para inducir la supresión de *Rhizoctonia solani* y/o *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y/o enfermedades producidas por cualquiera de los mismos, que comprende un sustrato y un cultivo biológicamente puro de *Trichoderma asperellum* cepa T34(2) CECT No. 20417.

3. Método para producir un sustrato supresor a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y/o *Rhizoctonia solani* y/o enfermedades causadas por los mismos, **caracterizado** porque comprende la inoculación de *Trichoderma asperellum* cepa T34(2) CECT No. 20417 en dicho sustrato.

4. Método según la reivindicación 3 donde el sustrato comprende una turba.

5. Método según la reivindicación 3 donde el sustrato comprende un compost.

6. Método según la reivindicación 5 donde el

compost es de corteza de madera dura.

7. Método según la reivindicación 5 donde el compost es de corteza de pino.

8. Método según la reivindicación 5 donde el compost es de corcho.

9. Método según la reivindicación 5 donde el compost es de fangos de depuradora.

10. Método según la reivindicación 5 donde el compost es de residuos de jardinería.

11. Método según la reivindicación 3 donde el sustrato comprende un medio de crecimiento formulado a base de compost del tipo CPV (compost-turba-vermiculita).

12. Uso de *Trichoderma asperellum* cepa T34 (2) CECT No. 20417 para el control biológico de la fusariosis vascular.

13. Uso de *Trichoderma asperellum* cepa T34 (2) CECT No. 20417 para el control biológico de la muerte de plántulas causada por *Rhizoctonia solani*.

25

30

35

40

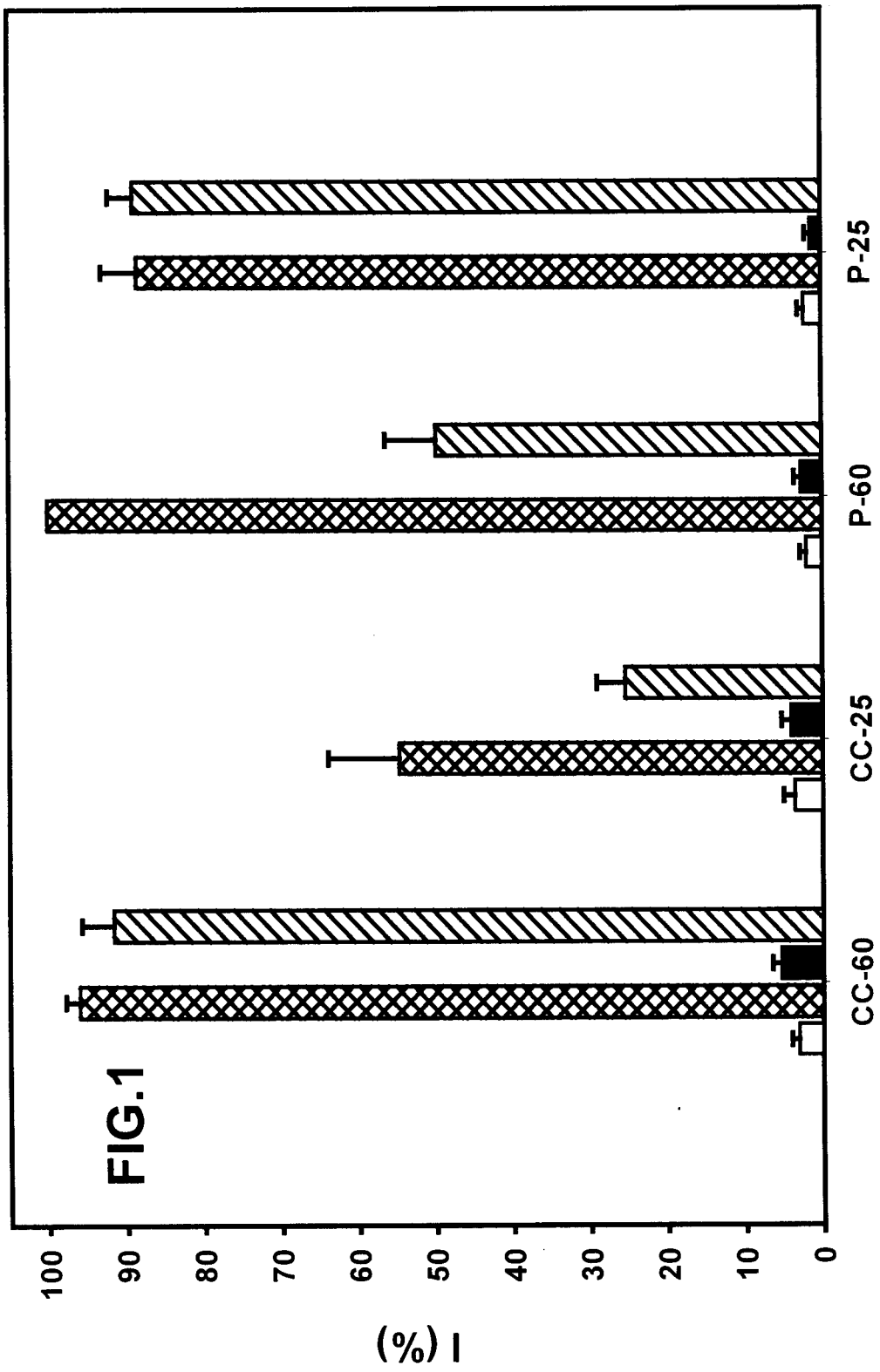
45

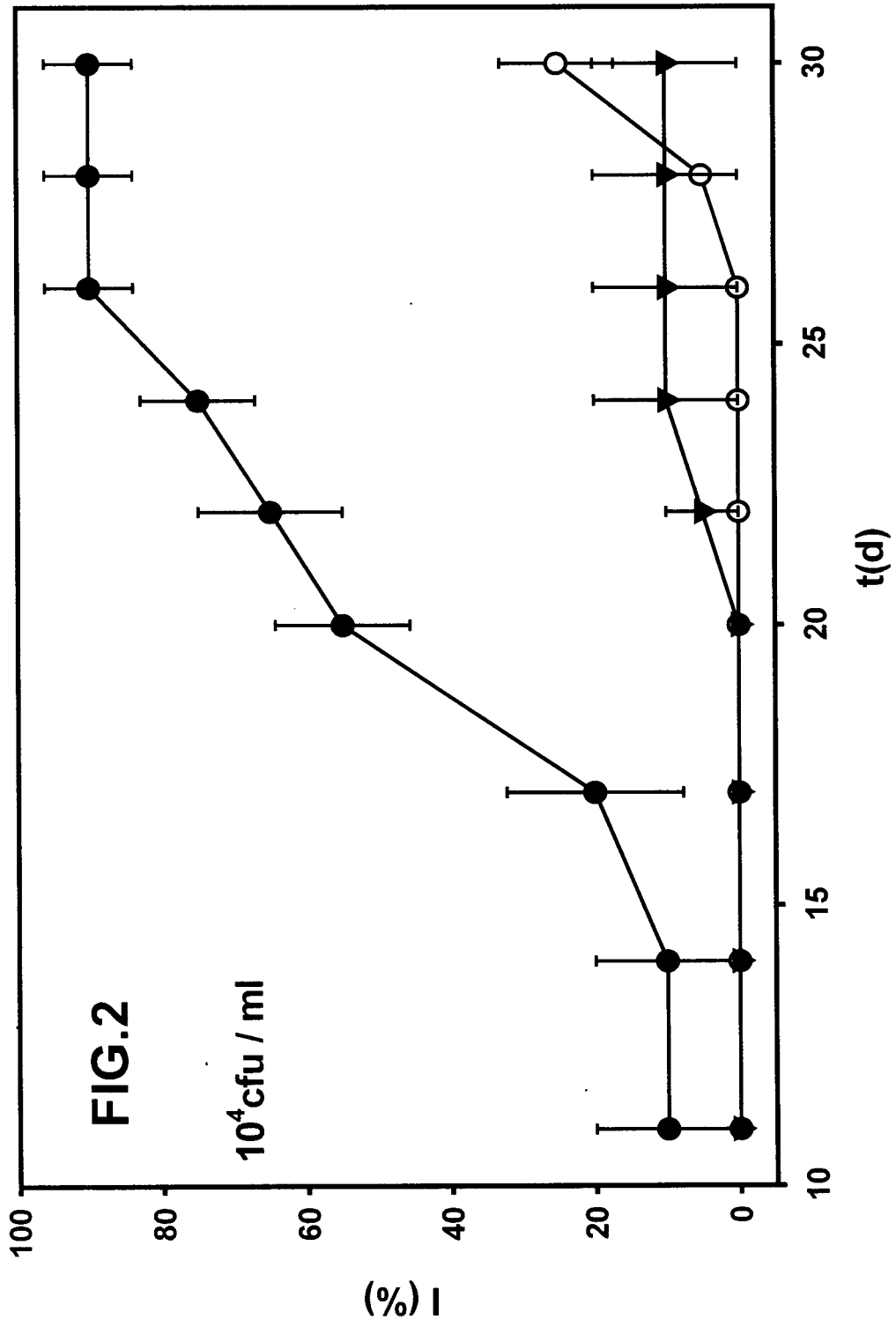
50

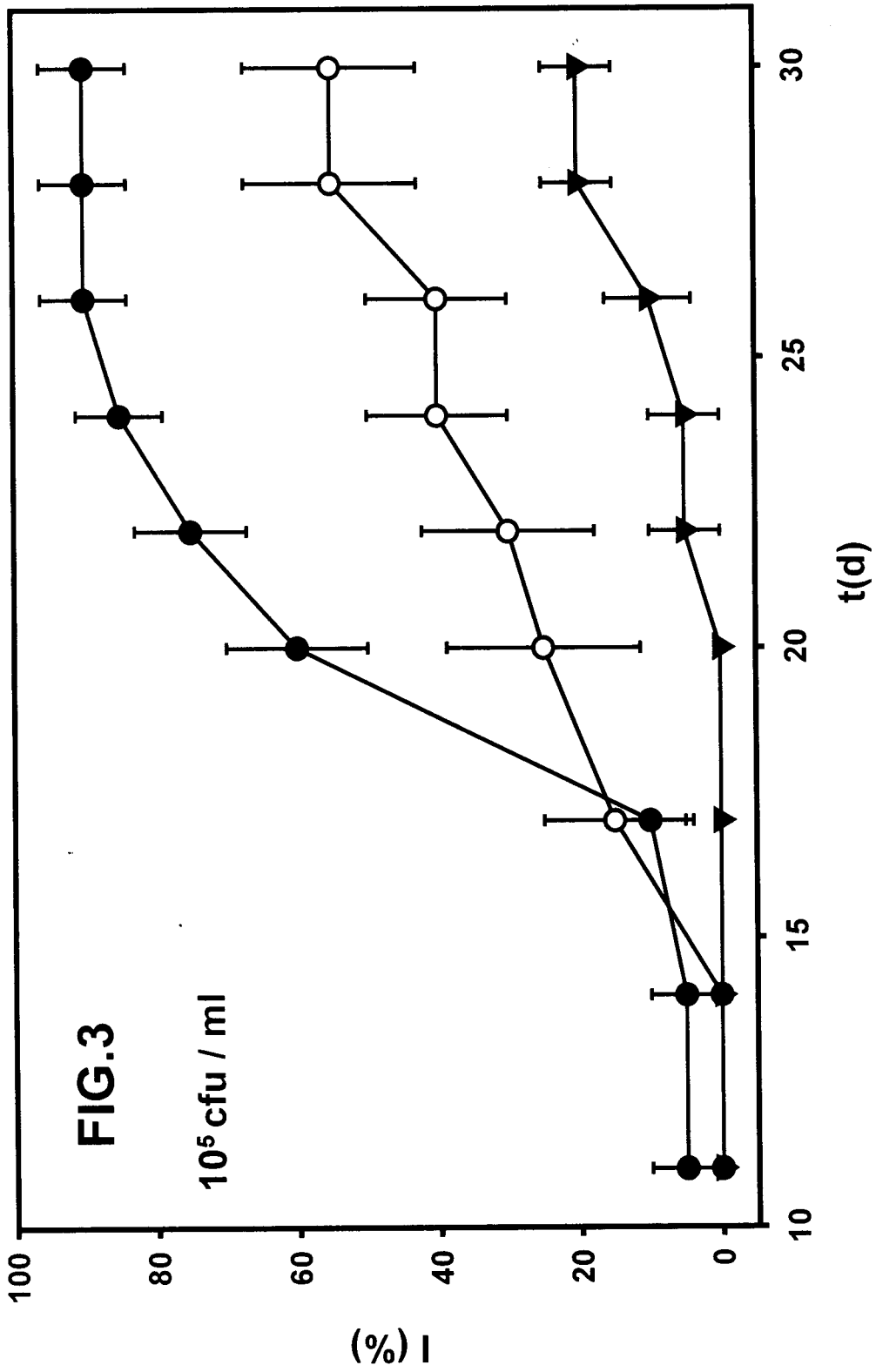
55

60

65









OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 188 385

② Nº de solicitud: 200101552

③ Fecha de presentación de la solicitud: **26.06.2001**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 1/14, A01N 63/04, C05F 11/08 // (C12N 1/14, C12R 1:885)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	GRONDONA, I. et al. Physiological and biochemical characterization of <i>Trichoderma harzianum</i> , a biocontrol agent against soilborne fungal plant pathogens. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , 1997, Vol. 63 (8), páginas 3189-3198.	1,12,13
Y	HERMOSA, M.R. et al. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of <i>Trichoderma</i> spp. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , 2000, Vol. 66 (5), páginas 1890-1898.	1,12,13
A	WO 0044222 A2 (LABORATORIO DE INVESTIGACIONES Y DIAGNÓSTICOS AGROPECUARIOS S.A. DE C.V.) 03.08.2000	1-5,12,13
A	LIECKFELDT, E. et al. A morphological and molecular perspective of <i>Trichoderma viride</i> : it is one or two species?. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , 1999, Vol. 65 (6), páginas 2418-2428.	1
A	LARKIN, R.P. y FRAVEL, D.R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of fusarium wilt of tomato. <i>Plant Disease</i> , 1998, Vol. 82 (9), páginas 1022-1028.	1-3,12
A	US 4900348 A (HOITINK) 13.02.1990	2,3,5-7,9
A	US 4748021 A (CHET et al.) 31.05.1988	2,3
A	HOITINK, HAJ y BOEHM, M.J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. <i>Annu. Rev. Phytopathol.</i> , 1999, Vol. 37, páginas 427-446.	2-11

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 22.05.2003	Examinador A. Polo Díez	Página 1/1
---	-----------------------------------	----------------------