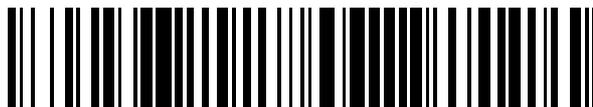


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 807**

21 Número de solicitud: 201132042

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

C12P 1/02 (2006.01)

C12R 1/885 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.12.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.07.2013

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
Ctra. Sacramento, s/n. Edf. CAE-OTRI
04120 La Cañada de San Urbano (Almería) ES

72 Inventor/es:

SANTOS HERNÁNDEZ, Milagrosa;
DIÁNEZ MARTÍNEZ, Fernando y
CARRETERO ESTEBAN, Francisco

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **NUEVA CEPA DE TRICHODERMA SATURNISPORUM, COMPOSICIONES Y APLICACIONES DE LA MISMA.**

57 Resumen:

Nueva cepa de *Trichoderma saturnisporum*, composiciones y aplicaciones de la misma. La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Trichoderma saturnisporum* con número de depósito CECT nº 20781. Asimismo se refiere a una composición fitosanitaria que comprende dicha cepa y a su empleo para el control biológico de plagas, para potenciar el crecimiento y/o producción de cultivos hortícolas o plantas y para la descomposición de materia orgánica.

ES 2 411 807 A1

DESCRIPCIÓN

NUEVA CEPA DE TRICHODERMA SATURNISPORUM, COMPOSICIONES Y APLICACIONES DE LA MISMA

SECTOR DE LA TÉCNICA

5 Esta invención se encuadra en el sector técnico de la microbiología agrícola, más concretamente en el relativo a la aplicación de microorganismos en los cultivos agrícolas para el control de plagas y/o enfermedades y la biofertilización y promoción del crecimiento vegetal.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

 El uso de microorganismos en agricultura ha experimentado un desarrollo notable en los últimos años. Su uso va orientado principalmente para dos fines: actuar como agente de control biológico de plagas o enfermedades de los cultivos y/o ejercer un efecto promotor del crecimiento vegetal.

15 Globalmente, las pérdidas en la producción agrícola debidas a plagas, malas hierbas y enfermedades de las plantas producidas por microorganismos constituyen un 30% del total. Sin embargo, en los países desarrollados de Europa y América del Norte estas pérdidas suponen hasta un 25 % del rendimiento agrícola y en aquellos países económicamente menos desarrollados pueden ascender hasta el 50 % de la
20 producción. En las últimas décadas, el control de enfermedades y plagas en los cultivos se ha basado exclusivamente en el control químico. La utilización de productos fitosanitarios en el control de enfermedades de plantas ha sido un elemento clave en la agricultura intensiva; sin embargo, la búsqueda de alternativas al uso de pesticidas para el control de plagas y enfermedades de los cultivos, es uno de los hechos más
25 relevantes que actualmente se están produciendo en agricultura. La pérdida de eficacia de los mismos frente a determinados patógenos, la limitación de residuos en los productos cosechados, los problemas que estos productos ocasionan tanto al medio ambiente como a la salud humana, así como la ineficacia de la resistencia genética por parte de los patógenos por la rápida modificación de la virulencia y los problemas de
30 comercialización de los productos agrícolas por la presencia de residuos en los mismos hacen necesario el desarrollo de nuevos métodos de control.

En los últimos años se ha originado un incremento en el desarrollo de productos orientados al control de plagas y/o enfermedades en los que la materia activa está formada por un organismo vivo: insectos, ácaros,...o un microorganismo, aplicados principalmente mediante una estrategia de control integrado basada en la combinación de la aplicación de agentes de control biológico y control químico. Por ello, la aplicación de agentes de control biológico puede considerarse como una alternativa o un complemento al control químico. La principal ventaja que poseen los agentes de control biológico frente a los químicos es que debido a su complejo modo de acción, resulta muy improbable la aparición de cepas resistentes del patógeno, además, suelen ser microorganismos pertenecientes a la flora autóctona, por lo que son medioambientalmente compatibles.

En cuanto a la fertilización de los cultivos, ésta se ha basado, principalmente, en el uso de fertilizantes de origen químico, reduciéndose al mínimo los aportes de materia orgánica.

Un biofertilizante es una sustancia que contiene microorganismos vivos, los cuales, cuando se aplican a semillas, superficies de plantas o suelos, colonizan la rizosfera o el interior de la planta y promueven el crecimiento de la misma. El término biofertilizante no debe ser usado de forma intercambiada con los términos abono verde, abono, intercultivo o fertilizante químico con suplemento orgánico (Vessey J. 2003. *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil (255): 571-586*). Ciertos microorganismos del suelo pueden incrementar la disponibilidad de nutrientes para las plantas, otros producen compuestos como vitaminas, hormonas y antibióticos que contribuyen a la salud vegetal y a la obtención de altos rendimientos.

La importancia económica de los biofertilizantes ha crecido en los últimos años; factores del mercado y el creciente predominio de una cultura de la sustentabilidad en el desarrollo económico son los dos principales fenómenos que impulsan la producción y el consumo de biofertilizantes en el mundo (Martínez C. y Ramírez F. 2000. *“Lombricultura y Agricultura Sustentable”*). Mayea (en Mayea S. 1995. *“Los biofertilizantes y su acción fitopatogena”*. *Memorias del III Encuentro Nacional Científico Técnico de Bioplaguicidas y EXPOCREE. INISAV, Ciudad de La Habana, p. 41*) señala que los microorganismos utilizados como biofertilizantes tienen un triple papel como suministradores de nutrientes, fitohormonas y antagonistas de hongos fitopatógenos.

Algunos de los microorganismos más utilizados, tanto para el control biológico como para la promoción del crecimiento de las plantas, comprenden a aquellos pertenecientes al género *Trichoderma* spp. Los hongos del género *Trichoderma* spp. han sido estudiados como promotores del crecimiento de plantas, como agentes de control biológico de enfermedades aéreas y como agentes de control biológico de patógenos de suelo. Su alta capacidad de colonización, y los diferentes mecanismos que emplean estos hongos, lo convierten en un efectivo elemento de control biológico. *Trichoderma* spp. coloniza las raíces de las plantas favoreciendo el desarrollo tanto aéreo como radical e impide el ataque de fitopatógenos radiculares (Santos y Diáñez, 2010. "Los antagonistas microbianos en el manejo de micosis de la parte aérea de las plantas. Organismos para el control de patógenos en los cultivos protegidos. Prácticas culturales para una agricultura sostenible. Colección agricultura 9: 511-528). Además, esta colonización radical genera resistencia sistémica controlando a su vez a patógenos aéreos (Yedidia I. et al. 2003. "Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and the accumulation of phytoalexins". *Applied Environmental Microbiology* (69): 7343-7353). Otros trabajos demuestran la capacidad del hongo para destruir estructuras de resistencia y propagación de hongos fitopatógenos, como son los esclerocios de *Sclerotinia cepivorum* por *Trichoderma viride* (Clarkson J.P. et al. 2002. "Selection of fungal biological control agents of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil". *Plant Pathology* 51: 735-745). Se ha observado una reducción de un 65% en la incidencia de *Phytophthora capsici* sobre plantas de pimiento (Ezziyyani M, Requena ME, Pérez Sánchez C, Egea Gilabert C & Candela ME. 2003. Mecanismos de biocontrol de la «tristeza» del pimiento (*Capsicum annuum* L.) por microorganismos antagonistas. *Actas de la XV Reunión de la Sociedad Española & VIII Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal*).

Se ha descrito como antagonistas de: *Fusarium*, *Botrytis*, (Salas W. et al. 2006. *Avances en el control biológico de Botrytis cinerea en Chile y tomate cultivados bajo techo. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* (78)). También ha sido empleada para recubrimiento de semillas, para evitar la caída de plántulas e incrementar la protección de la misma (Ezziyyani M. et al. 2004. "Trichoderma harzianum como biofungicida para el control de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento" (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* (26): 35-45). Asimismo, ha sido detectado en el interior de las raíces de plantas, incrementando su efectividad en el control de patógenos radiculares (Avila M.E. et al. 2006. "Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and

endorhiza of garlic (Allium sativum L.) by strains of Trichoderma harzianum and their capacity to control allium white-rot under field conditions". Soil Biology and Biochemistry 38(7): 1823-1830).

En cuanto a su capacidad biofertilizante, *Trichoderma* spp. posee una gran capacidad de colonización de distintos ambientes debido a que crece muy rápidamente, tiene pocos requerimientos nutricionales y sobrevive en condiciones muy adversas (Papavizas G. 1985. "Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology, and potential for biocontrol". *Annual review of phytopathology* 23: 23-54). La promoción del crecimiento vegetal por parte de *Trichoderma* es un fenómeno que se ha observado en varios tipos de cultivos (Harman G., et al. 1989. "Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments". *Plant Diseases* 73: 631-637) (Lindsey D. y Baker R. 1967. "Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions". *Phytopathology* 57: 1262-1263). Este fenómeno se manifiesta como una potenciación de la germinación de las semillas, una floración más abundante y temprana y aumentos de altura y peso de las plantas (Chang Y., et al. 1986. "Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*". *Plant disease* 70: 145-148; 76: 60-65).

Trichoderma frecuentemente incrementa el crecimiento de raíces y su desarrollo, productividad del cultivo, resistencia a estrés abiótico y la toma y uso de nutrientes (Arora D. et al. 1992. *Handbook of applied Mycology: Fungal Biotechnology*. Marcel Dekker). Podría ser la capacidad de *Trichoderma* de solubilizar metales, como el zinc, el manganeso, el hierro o el cobre, convirtiéndolos así en nutrientes asimilables por las plantas (Altomare C., et al 1999. "Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* rifai 1295-22". *Appl Environ Microbiol* 65: 1926-2933). Otro efecto indirecto podría ser la eliminación de la rizosfera de patógenos de menor incidencia, como es el caso de *Pythium*, sin los cuales las plantas alcanzarían su máximo potencial de desarrollo (Harman et al., 1989).

Se ha comprobado que *Trichoderma harzianum* es estimulador de crecimiento en múltiples cultivos (Parets S. 2002. "Evaluación agronómica de la coinoculación de micorrizas arbusculares, *Rhizobium phaseoli* y *Trichoderma harzianum* en el cultivo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)". Tesis en opción al grado de Máster en Ciencias Agrícolas, Universidad Agraria de La Habana); (Fernández F. 1999. Manejo de las asociaciones micorrízico-arbusculares (MA) sobre la producción de posturas de cafetos (*C. arabica* L.) en algunos tipos de suelos. Tesis de Doctorado, INCA, La Habana, 118

pp). La aplicación de *Trichoderma* spp. ha producido en varias especies vegetales el incremento de la velocidad y porcentaje de germinación, reducción de los efectos causados por condiciones de estrés ambiental (Björkman T., et al. 1998. *Growth Enhancement of shrunken-2 (sh2) Sweet Corn by Trichoderma harzianum* 1295-22: 5 *Effect of Environmental Stress. J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123(1): 35-40); aumento de la altura de las plantas, aumento de peso seco y tamaño de las raíces; el adelantamiento de los momentos de floración y cosecha; aumento del número de flores por planta y mayor tamaño de los frutos (Kleifeld O. y Chet I. 1992. "Trichoderma harzianum - interaction with plants and effect on growth response". *Plant and Soil* 144: 267-272).

10 Algunas especies de *Trichoderma* han sido consideradas como estimuladoras de crecimiento en especies tales como clavel, crisantemo, tagetes, petunia, pepino, berenjena, arveja, pimienta, rábano, tabaco, tomate, lechuga, zanahoria, patata, algodón, frijol y pastos ornamentales (Kleifeld y Chet, 1992); (Windham M., Elad Y. y Baker R.. 1986. "A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp". 15 *Phytopathology* 76: 518-521); (Reyes M. 2005. "Use of 3Tac (*Trichoderma*) in the clean Tobacco growing". *International botanical Congress. March. Viena. Abstract*). En los ensayos recogidos en González CH., Rodríguez L., Arjona C., Puertas A. Fonseca M. 1999. *Efecto de la aplicación de Trichoderma harzianum r. sobre la composición* 20 *cuantitativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizosfera de solanaceas y su influencia en el crecimiento vegetativo. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. Vol. 14 (1-2)*, se comprobó que *Trichoderma harzianum* influía significativamente sobre el incremento de la masa fresca, la altura y el diámetro del tallo en plantas de tomate. En experimentos de invernadero se ha llegado a observar un aumento de la producción de hasta el 300% (Hornby D. 1990. "Biological control of soil-borne plant pathogens". Wallingford, UK: 25 CAB International); (Cruz M., Cisterna V. 1998. "Control integrado de *Phytophthora capsici* en pimiento y efecto de hongos antagonistas sobre el crecimiento de las plantas". *Agricultura técnica (58) 2: 91-92*). Estudiando los efectos de *Trichoderma harzianum* y *Gliocladium virens* sobre plantas de pimiento, observaron un efecto estimulador del crecimiento. La estimulación del crecimiento observada en las plantas 30 tratadas con suspensiones de conidias de *T. harzianum*, está en correspondencia con lo obtenido por diversos autores (Lindsey y Baker, 1967; Kloepper J., Schroth M., 1981. *Plant growth promoting. Phytopathology* 71: 642-644.; Chang et al., 1986). *Trichoderma harzianum* tienen el potencial de aumentar el crecimiento y desarrollo de las plantas; esto parece deberse a la inhibición de patógenos menores y a la producción de factores 35 que estimulan el crecimiento de la planta y favorecen la toma de nutrientes (Widham et

al., 1986; Chang et al., 1986; Chet I. 1987. *Trichoderma – application mode of action, and potencial as biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi*. Pp: 137-160. Ed. *Innovative approaches to plant disease control*, New York).

5 Las cepas de *Trichoderma* spp. están siempre asociadas con raíces de plantas y ecosistemas de raíces. Algunos autores han definido las cepas de *Trichoderma* como plantas simbiotes oportunistas, organismos avirulentos, capaces de colonizar raíces de plantas por mecanismos similares a los de los hongos micorrizales y producir compuestos que estimulan el crecimiento como citoquininas, zeatinas y giberelinas (GA3) o relacionadas con GA3; así como promover mecanismos de defensa en plantas
10 (*Harmen G., et al. 2004. "Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts". Nature Reviews 2:43-56*). El género *Trichoderma* es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos (*Fernández, 2001*).

15 El origen marino de esta especie, le permite resistir elevadas concentraciones de sales, por lo que su supervivencia en suelos áridos y con estrés salino está garantizada.

La salinización de los suelos en tierras de regadío está dando lugar a pérdidas en los rendimientos de los cultivos; este hecho es especialmente relevante, ya que el 40% de la producción mundial de alimentos se realiza en tierras de regadío y el problema de la salinización afecta a más del 8% de la superficie de regadío mundial, llegando esta
20 cifra al 25% en regiones áridas y semiáridas. En este contexto, el uso de microorganismos adaptados a condiciones de salinidad que estimulen el desarrollo vegetal e incrementen los rendimientos de los cultivos bajo estas condiciones es un factor de gran relevancia para el sostenimiento de los sistemas de cultivo agrícolas.

25 Los productos en base a *Trichoderma* se han multiplicado en los últimos años, existiendo alrededor de 60 productos a nivel mundial, la mayoría de ellos basados en el uso de cepas de las especies *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*. En menor medida existen productos formulados en base a las siguientes especies y/o combinaciones de ellas: *Trichoderma koningii*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma parceanamosum*, que se comercializan en las dos vertientes mencionadas, para su uso en el control de enfermedades y/o para su uso como bioestimulante de los cultivos, tanto semillero, campo como ornamentales.

Los formulados preparados a partir de microorganismos pueden ejercer un efecto supresor contra uno varios patógenos.

5 Las condiciones particulares de la agricultura intensiva, así como las restricciones tanto de las materias activas empleadas en el control de patógenos, como en la reducción de empleo de fertilizantes, exigen de alternativas que optimicen el sistema productivo. Es por tanto deseable disponer de alternativas que incrementen la disponibilidad de los productos existentes en el mercado, permitiendo de este modo ampliar las posibles estrategias en el manejo agronómico de los cultivos,
10 particularmente en lo que se refiere al uso de microorganismos en agricultura.

Ahora, los autores de la presente invención han identificado una nueva cepa de la especie *Trichoderma saturnisporum*. Esta nueva cepa, denominada Ca1606, proporciona un nuevo antagonista en el control de diversos patógenos de plantas y, por ello, una alternativa biológica al uso de pesticidas, así como una alternativa o
15 complemento al uso de fertilizantes o bioestimulantes químicos, debido a su capacidad de promover el desarrollo de las plantas de diferentes cultivos, así como su producción.

Hasta el momento, no se había descrito ninguna cepa de esta especie (*T. saturnisporum*) activa frente al control y bioestimulación de plantas en cultivo. Únicamente existen referencias que describen el trabajo de enzimas producidas por determinadas cepas que pueden intervenir en el control de algún patógeno. No hay
20 descrito nada sobre la promoción que ejerce en el desarrollo de plantas, y menos aún en invernaderos.

No existen tampoco antecedentes en el estado de la técnica del empleo de ninguna cepa de *T. Saturnisporum* in vivo, ni en promoción del crecimiento de plantas en cultivo, es decir, desarrollo de mejor calidad de plantas, y mucho menos de incrementos
25 positivos de rendimiento de los cultivos en campo. Así, por ejemplo, en el artículo de Ajith P.S. et al "*Effect of volatile and non-volatile compounds from Trichoderma spp. Against Colletotrichum cpassici incitant of Anthracnose on Bell peppers*" *Nature and Science 2010; vol. 8, nº 9, pag 265-269* ó en el documento de Camagun "*Managing Plant Diseases and Promoting Sustainability and Productivity with Trichoderma*" *Searca Professorial Chair Lecture*, se muestran únicamente resultados obtenidos in vitro, midiendo la inhibición del crecimiento del micelio de diferentes patógenos. En ambos
30 documentos se muestran resultados que no superan el 50% de inhibición del

crecimiento micelial para los fitopatógenos ensayados, lo que, posiblemente daría lugar a un nulo control en campo.

El adecuado manejo del producto basado en esta nueva cepa, con la consiguiente producción y formulación, así como el control de la dosificación y su manejo en campo, permite obtener un producto final que cumple con los requisitos necesarios para un correcto funcionamiento, procurando el control de enfermedades sobre un amplio abanico de especies vegetales y/o cultivos y un efecto promotor del crecimiento que supera al obtenido con cepas de otras especies de *Trichoderma*.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial ejercido por *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 sobre diferentes patógenos.

Figura 2. Mortandad de plantas (%) tras la inoculación de plantas con *Didymella bryonae* y control de la enfermedad mediante la aplicación de *T.saturnisporum* Ca1606 (T2), a tres dosis diferentes (D1, D2 y D3) y mediante dos formas de aplicación, riego (R) y pulverizado (P) y un testigo en blanco.

Figura 3. Longitud (cm) alcanzada por plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), inoculadas con *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 (T2) y comparada con un tratamiento en el que se usó otra cepa de *Trichoderma* sp. (T1) y un testigo en blanco (Test).

Figura 4. Número de hojas verdaderas alcanzado por plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), inoculadas con *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 (T2) y comparada con un tratamiento en el que se usó otra cepa de *Trichoderma* sp. (T1) y un testigo en blanco (Test).

Figura 5. Índice de esbeltez de Schmidt-Vogt (IE) para cada tratamiento, y representación de las diferencias significativas entre los distintos tratamientos. (Anova LSD 95 %). 2T1A y B (*Trichoderma saturnisporum* a la dosis de $1,5 \cdot 10^6$ conidias y $1,5 \cdot 10^5$ conidias/planta, respectivamente), 2T2 A y B (*Trichoderma saturnisporum* Ca1606 a la dosis de $1,5 \cdot 10^6$ conidias y $1,5 \cdot 10^5$ conidias/planta, respectivamente), 2TC A y B (*Trichoderma comercial* a la dosis de $1,5 \cdot 10^6$ conidias y $1,5 \cdot 10^5$ conidias/planta,

respectivamente), y 2 (T1+T2)B (*Trichoderma saturnisporum* (T1) y *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 a la dosis $5 \cdot 10^5$ conidias /planta).

5 **Figura 6.** Peso (gr) medio del melón tipo cantaloup obtenido de semillas inoculadas con *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 (T2) y comparada con dos tratamientos en los que se usaron otra dos cepas de *Trichoderma* sp. (T1 y Tc) y un testigo en blanco (To).

Figura 7. Producción (kg) de melón tipo cantaloup obtenido de semillas inoculadas con *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 (T2) y comparada con dos tratamientos en los que se usaron otra dos cepas de *Trichoderma* sp. (T1 y Tc) y un testigo en blanco (To).

10 **Figura 8.** Porcentaje de degradación del tallo de tomate con respecto al peso seco inicial tras la aplicación de *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 al suelo enarenado y de un testigo en blanco.

OBJETO DE LA INVENCION

15 Es objeto de la invención una nueva cepa de *Trichoderma saturnisporum* con número de depósito CECT n1 20781.

Es también objeto de la invención una composición fitosanitaria que comprende dicha cepa.

20 Asimismo, es objeto de la invención el empleo de la cepa, y de la composición que la comprende, para el control biológico de plagas, para potenciar el crecimiento y/o producción de cultivos hortícolas o plantas y para la descomposición de materia orgánica.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

25 La presente invención hace referencia a una nueva cepa antagonista, denominada Ca1606, de la especie *Trichoderma saturnisporum*. Dicha cepa constituye un eficaz microorganismo bioestimulante y promotor del crecimiento de las plantas y/o cultivos, así como un elemento eficaz para el control biológico de enfermedades.

Este hongo antagonista, cultivado en forma biológicamente pura, se denomina Ca1606 y se ha identificado de acuerdo a los criterios de Kubicek y Harman (*KUBICEK*

P., HARMAN E. 1998. *Trichoderma and Gliocladium. V1. Basic biology, taxonomy and genetics V1. Taylor and Francis*) y mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) y posterior secuenciación de la región ITS (Internal Transcriber Spacer) del ADNr utilizando los cebadores ITS-1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) (SEQ ID NO 1) e ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (SEQ ID NO 2).

Las secuencias obtenidas son las siguientes:

- SEQ ID NO 3 (empleando el cebador ITS 1)

GTGAACGTTCCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGCGCGTCCG
 10 AGCCCCGGATCCCATGGCGCCCCGCCGAGGACCAACCAAACCTTTTTTCTCTC
 TCCGTCGCGGCTCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGG
 CGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTT
 GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCT
 15 GCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGG
 TCGGCGTTGGGGATCGGCCCCCTCACCGGGGCGCCCCCGAAATCCAGTGG
 CGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACTCGCACCGGGAG
 CGCGGCGCGGCCACAGCCGTAAAACACCCCAAACCTCTGAAATGTTGACCTCG
 GATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATNTTATNTNTGGGGNNGGNANG
 20 AAA

- SEQ ID NO 4 (empleando el cebador ITS 4)

ANGTTTGGGGNNGNNNTCGGCTGNGGCCGCGCCGCGCTCCCGGTGCGAGTGT
 GCAAACACTACTGCGCAGGAGAGGCTGCGGGCAGACCGCCACTGGATTTGCGGG
 GCGGCCCGGTGAGGGGGCCGATCCCCAACGCCGACCCCGGAGGGGTTT
 25 GAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCG
 CAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATCACTGAATTCTGCAATTCACACTTA
 TCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAA
 AGTTTTGATTCATTTTCGAGACGCCGCTAGGGTCGCCGAGAAAGGCTCAGAG
 CAAAATAAAACAGAGCCGCGACGGAGCCGCGACGGAGAGAGAAAAAGAGTT
 30 TGGTTGGTCCTCCGGCGGGCGCCATGGGATCCGGGGCTGCGACGCGCCCGG
 GGCAGAGATCCCGCCGAGGCAACAGATTGGTAACGTTTACATTGGGGTTTGG
 GAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCNGGGGGNCCCCCCCNCNCGG

5 La cepa Ca1606 de *Trichoderma saturnisporum* fue depositada el 28 de Junio de 2011, en la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, 56100 Burjassot, Valencia, España) con CECT N° 20781 según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Fines del Procedimiento de Patente.

El antagonista *Trichoderma saturnisporum* cepa Ca1606 se aisló de un suelo procedente de cultivo de clavel en la costa Noroeste de Cádiz en el cual se ha descrito la existencia de supresividad a la Fusariosis Vascular, enfermedad ocasionada por formas especializadas de *Fusarium oxysporum*.

10 La velocidad de crecimiento de *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 en medio de cultivo agarizado (agar-malta) y en estufa a 25 °C ha sido de:

- Día 0: 0 mm
- Día 1: 3,5 mm
- Día 2: 21,9 mm
- 15 - Día 3: 46, 8 mm
- Día 4: 68 mm

20 La cepa *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 ha sido ensayada en condiciones de laboratorio y de campo. No existe ninguna descripción de esta especie, ni de la cepa de la presente invención, como microorganismo capaz de controlar fitopatógenos de importancia en cultivos agrícolas, ni como promotor del desarrollo de plantas, ni con capacidad de incrementar la producción de dichos cultivos a nivel de campo. Este último hecho otorga una notable ventaja respecto a otras cepas de *Trichoderma* comercializadas, ya que los ensayos se han realizado en condiciones de uso comercial en el que, a modo de ejemplo, se puede indicar que en ningún caso en los que se ha
25 ensayado se ha realizado una desinfección o esterilización de los sustratos o suelos en los que se ha realizado la inoculación, práctica que en general es recomendada para muchos productos de este tipo, lo que supone una ventaja respecto a los existentes.

30 Dadas las propiedades de esta nueva cepa, en la presente invención se contempla su uso para el control biológico de plagas y para potenciar el crecimiento y/o producción de cultivos hortícolas o plantas. Asimismo, los autores de la presente invención han identificado la capacidad de esta cepa para descomponer materia orgánica.

La presente invención contempla el sistema formado por la asociación planta-Trichoderma que comprende una planta o semilla y la cepa *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 y cualquier combinación con la misma, es decir, la cepa puede incorporarse a la semilla, al sustrato donde se va a sembrar o simplemente añadirla en agua de riego.

5 La cepa *Ca1606* de la presente invención presenta alta capacidad para colonizar las raíces, cuando se aplica en la rizosfera o sobre la semilla, introduciéndose en la raíz y comportándose como un hongo micorrízico. Además tiene la capacidad de desarrollarse sobre la parte aérea de las plantas sobre las que se aplica. Este aislado presenta una capacidad de supervivencia altamente versátil, adecuada a la aplicación
10 en zonas agrícolas semi-áridas así como templadas, en invernadero o al aire libre y en el almacenamiento o transporte de productos agrícolas.

Sin establecer ninguna limitación, los efectos provocados por *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 afectan al crecimiento de la planta, que puede ser en forma de incrementar la masa de la raíz, profundidad radicular, calibre del tallo o longitud de
15 planta. Se produce también un incremento de producción y calidad de la cosecha, y un incremento en la calidad pretrasplante de plántulas hortícolas y ornamentales. Se pueden producir fenómenos de inducción de resistencia a diversos tipos de estrés. Asimismo, el empleo de la cepa Ca1606 permite incrementar la producción en campo.

Trichoderma saturnisporum Ca1606 se puede aplicar en cualquier medio y
20 ambiente sin limitación (al suelo, a un sustrato, a un cultivo hidropónico simplemente adicionándolo al agua) siempre y cuando se encuentre en las condiciones adecuadas (es decir, las condiciones normales de un cultivo).

En otro aspecto principal de la invención se contempla una composición fitosanitaria (composición de la invención) que comprende un cultivo biológicamente puro de la cepa
25 Ca1606 o cualquier producto o microorganismo derivado de dicho cultivo, incluso mezclado con otros microorganismos, y un vehículo para su dispersión y/o multiplicación.

Estas composiciones bioestimulantes pueden estar en forma sólida, líquida, gelificada o coloidal, o formando parte de un sustrato o semilla. Asimismo, pueden
30 incluir otros adyuvantes, tales como emulsionantes, agentes de suspensión, agentes de pegajosidad, etc, así como otros u otros agentes de estimulación del crecimiento y control biológico.

Las composiciones sólidas pueden estar en forma de polvo, gránulos o polvos humectables, mientras que las composiciones líquidas pueden estar en forma de medios acuosos o no acuosos, en soluciones, suspensiones, dispersiones o de forma concentrada. Asimismo, la cepa *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 puede incluirse en matrices de biopolímeros (sin excluir otras posibles formulaciones) tales como alginato de calcio, agar..., y los posibles aditivos que se consideren para cada situación a la que se destine el producto.

El vehículo puede constituir total o parcialmente una base alimenticia para el antagonista. La base alimenticia y el vehículo proporcionan al microorganismo nutrientes suficientes y un micro-ambiente favorable lo que facilita su establecimiento y el micro-ambiente a largo plazo y la supervivencia a largo plazo sobre los órganos de la planta o en el suelo. La formulación desarrollada permite mantener las esporas del hongo viable por largos periodos de tiempo (años), manteniendo su supervivencia y su capacidad germinativa, en el momento de la aplicación. Asimismo, la formulación no permite la germinación de las esporas durante su conservación.

Así, en una realización particular de la composición de la invención, el vehículo se selecciona de entre un sustrato y un medio sólido, líquido, coloidal o gelificado, donde van a ir incorporados las esporas del hongo.

En el contexto de la presente invención, un sustrato es una mezcla de diversos materiales que se pueden utilizar para el crecimiento de plantas. Un sustrato generalmente comprende uno o más tipos de agregados ligeros neutros (perlita, vermiculita...) 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, según el tamaño de maceta, tipo de planta a producir, sistema de riego...

Los materiales para producir los sustratos 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*, o la fibra de coco. La turba de *Sphagnum* por lo general es un componente pobre en energía y que no ofrece control de las enfermedades de las plantas. La aplicación de microorganismos como el de la presente invención supone una mayor ventaja para el desarrollo de las plantas en los mismos.

En otras realizaciones particulares los sustratos son compost, preferiblemente los obtenidos de orujo de vid, champiñón, residuos hortícolas, residuos sólidos urbanos, residuos de jardinería, vermicompost y combinaciones de los mismos. En realizaciones preferidas de la composición de la invención, se emplean sustratos formulados a base de turba o de compost del tipo TCP (Turba+compost+perlita), compost-turba-vermiculita, compost-turba-fibra de coco, o cualquier combinación de los mismos.

Una ventaja importante de los sustratos empleados en la presente invención es que son bioestimulantes del crecimiento de las plantas a la vez que supresores de enfermedades de importancia en semilleros y otros cultivos. A pesar de que existen otras especies de *Trichoderma*, capaces de promover el desarrollo de las plantas al combinarlas en sustratos, esta invención describe por primera vez la capacidad de esta especie, *T. saturnisporum*. Además se ha comprobado un aumento de la calidad pretrasplante de plántulas hortícolas producidas en semillero, comprobación novedosa, ya que este tipo de evaluaciones no se aplica en semillero, por lo que el incremento en la calidad de las mismas ha quedado demostrado. Esto es ventajoso desde el punto de vista de la simplicidad y de la economía. Su capacidad bioestimulante radica principalmente en su capacidad de interacción con la raíz, introduciéndose en el interior de ella, comportándose como un hongo micorrízico.

La obtención de la composición fitosanitaria de la invención se lleva a cabo mediante la inoculación de la cepa Ca1606 en el vehículo correspondiente, bien incorporada a un sustrato comercial como turba, o resuspendiendo las esporas a la dosis comercial en el vehículo que se desee ya sea líquido o sólido y que permita su supervivencia.

La composición de la invención es eficaz en reprimir enfermedades causadas por patógenos de importancia en los cultivos hortícolas, por lo que en otro aspecto principal de la invención se contempla el uso de la composición de la invención para el control biológico de plagas. De forma particular, *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 produce altos valores de inhibición del crecimiento micelial de: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*, *Botrytis cinerea*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora parasitica*, *Verticillium dahliae*, *Mycosphaerella pinodes* y *Didymella bryoniae*.

En realizaciones particulares de la presente invención, la composición se emplea en el control de la Fusariosis Vascular. La fusariosis vascular incluye a todas aquellas

formas especializadas de la especie de *Fusarium oxysporum* que son capaces de afectar a los vasos de las plantas, como por ejemplo, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* para el tomate; f.sp. *Dianthi*, para el clavel; f.sp. *melonis* para el melón. En otras realizaciones particulares, el patógeno responsable de la plaga se selecciona entre *Botrytis cinérea*, *Mycosphaerella pinodes*, *Pythium* sp, *Phytophthora* parasítica, *Fusarium solani* y *Verticillium dahliae*.

En otro aspecto principal de la invención se contempla el uso de la composición para potenciar el crecimiento y/o producción de cultivos hortícolas o plantas. Las plantas que pueden ser susceptibles de promoción del crecimiento comprenden plantas hortícolas, ornamentales e incluso forestales.

Los métodos de aplicación de *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 se realizan principalmente por medio de conidias, aunque también se puede aplicar por medio de clamidosporas o segmentos de hifas o sus combinaciones. Sin establecer limitaciones, normalmente la composición comprende uno o varios coadyuvantes y el microorganismo en cuestión a una concentración de conidias que puede variar entre $1 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^{12}$ conidias/mL de composición. Dicho microorganismo se ha producido tanto en un medio de cultivo de base líquida, como en un medio de cultivo de base sólida suplementada con los elementos nutricionales requeridos para cada caso.

La propagación de las células del microorganismo depende de las condiciones de crecimiento dentro de la composición o en las plantas sobre las que se aplica, así como el sistema de cultivo empleado. Factores tales como el tiempo de almacenamiento de la composición pueden tener un efecto sobre las condiciones de crecimiento del antagonista y por lo tanto se prepara en una composición que contenga una formulación que permita la viabilidad o supervivencia por largos periodos de tiempo.

En otro aspecto principal de la invención se contempla el empleo de la composición fitosanitaria de la invención para la descomposición de materia orgánica.

Los ejemplos que siguen a continuación ilustran la presente invención, pero no deben ser considerados como limitaciones a los aspectos esenciales del objeto de la misma, tal como han sido expuestos en los apartados anteriores de esta descripción.

Ejemplo 1

Una cepa del género *Trichoderma* spp. se aisló de un suelo supresivo a la Fusariosis Vascular como sigue:

5 Se realizó una suspensión con 1 g de suelo en agua estéril. A continuación se realizaron diluciones sucesivas, y de cada una de las suspensiones se realizó extensión en Placa de Petri, incubación y posterior identificación de las colonias formadas. La cepa pura resultante se denominó Ca1606 y se identificó de acuerdo a los criterios de Kubicek y Harman (1998) y mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) y posterior
10 secuenciación de la región ITS (Internal Transcriber Spacer) del ADNr, perteneciendo a la especie *Trichoderma saturnisporum*.

Ejemplo 2

15 La cepa *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 se dejó crecer en medio de cultivo agarizado PDA en ambiente de laboratorio y se procedió a evaluar la cantidad de conidias producidas por Placa de Petri. A continuación se procedió a la extracción de conidias y cuantificación en hematocímetro de su concentración. El producto final en agua estéril alcanzó una concentración entre $1 \cdot 10^8$ - $3 \cdot 10^8$ conidias/mL.

20 Los ensayos de viabilidad en matrices de alginato y en medio salino mostraron viabilidad de conidias en el 100% de los casos, después de periodos de almacenamiento de 8 meses. Así como una adecuada conservación en dichos formulados, que se manifestaron en la ausencia de germinación en los mismos durante el periodo de almacenamiento.

Ejemplo 3

25 Ensayos de inoculación realizados a nivel de laboratorio, mostraron efectos antagonistas sobre algunos patógenos de importancia de los cultivos hortícolas (Figura 1) (*Fusarium oxysporum f.sp.niveum* (Fon), *Fusarium oxysporum f.sp. melonis* (Fom), *Fusarium Solani* (F.solani), *Botrytis cinerea* (B. cinerea), *Mycosphaerella pinodes* (M.pinodes), *Phytium aphanidermatum* (Phytium), *Verticillium dahlie* (V. dahlie),
30 *Phytophthora parasitica* (P. parasitica))

El % de inhibición del crecimiento de cada uno de los 8 patógenos seleccionados fue en todos los casos alto (Fig. 1). En todos los casos existió diferencia significativa respecto a los testigos correspondientes según el análisis ANOVA (los tratamientos que no llevaban incorporados *T. saturnisporum*, presentaron una inhibición del crecimiento micelial de cero) (LSD 95 %).

Ejemplo 4

En la figura 2, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma saturnisporum* CA1606 en el control de *Didymella bryoniae* en plantas de melón. Se aplicó a tres dosis, D1, D2 y D3, que se corresponden con 10^5 , 10^6 y 10^7 esporas/mL. La aplicación se realizó mediante riego (R) o pulverizadas (P) sobre la planta. Los resultados revelan que el mejor control de la enfermedad se realizó mediante el pulverizado, no superando el 5% de plantas muertas y, aunque a la dosis más baja se obtuvo menor mortandad, no se observaron diferencias significativas entre las tres dosis aplicadas mediante la pulverización. Asimismo, también se consiguió un control de la enfermedad mediante su aplicación en riego, aunque menos efectivo que el pulverizado, existiendo igualmente diferencias significativas con el testigo. Las letras (a, b, c) hacen referencia al análisis estadístico realizado. Cuando son distintas es que muestras diferencias significativas.

Ejemplo 5

Trichoderma saturnisporum Ca1606 fue inoculada sobre plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) var. San pedro, mediante humectación de la semilla en alveolos con turba, a una concentración de $1 \cdot 10^8$ conidias/semilla. Los ensayos pusieron de manifiesto la existencia de un efecto promotor del crecimiento de estas plantas cuando fueron comparadas con sus respectivos testigos en los que no se había aplicado la cepa *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 (Fig 3, Fig 4). En la figura 3 se muestra la longitud alcanzada por las plantas de tomate inoculadas con *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 (T2), con otra cepa de *Trichoderma* sp. (T1) y con un testigo en blanco (Test).

En la figura 4 se muestra el número de hojas verdaderas alcanzado por plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), inoculadas con *Trichoderma saturnisporum* Ca1606

(T2) y comparada con un tratamiento en el que se usó otra cepa de *Trichoderma* sp. (T1) y un testigo en blanco (Test).

Los resultados de crecimiento vegetal obtenidos con la cepa de la presente invención superan a los obtenidos con otras especies comercializadas de *Trichoderma* y con el testigo en blanco.

Ejemplo 6

Conidias de *Trichoderma saturnisporum* Ca1606 fueron aplicadas al sustrato (turba+fibra de coco+perlita) sobre plantas de sandía injertadas en un semillero comercial. Los resultados pusieron de manifiesto un efecto promotor del crecimiento así como un incremento en la calidad pretrasplante de las plántulas obtenidas. Se aplicó *Trichoderma saturnisporum* a tres concentraciones de inóculo conocidas: $1,5 \cdot 10^6$ conidias/planta, $1,5 \cdot 10^5$ conidias/planta y $5 \cdot 10^5$ conidias/planta, frente a un producto comercial y se compararon frente a un testigo en el que no se realizó aplicación alguna de estos productos.

El índice de Esbeltez relaciona la resistencia de la planta con la capacidad fotosintética de la misma. Valores altos de este índice son indicativos de una planta más robusta y con menos probabilidad de daño de algún tipo en el trasplante.

Se hizo un ensayo con diferentes tratamientos: 2T1A y B (*Trichoderma saturnisporum* a la dosis de $1,5 \cdot 10^6$ conidias y $1,5 \cdot 10^5$ conidias/planta, respectivamente), 2T2 A y B (*Trichoderma saturnisporum* Ca1606 a la dosis de $1,5 \cdot 10^6$ conidias y $1,5 \cdot 10^5$ conidias/planta, respectivamente), 2TC A y B (*Trichoderma comercial* a la dosis de $1,5 \cdot 10^6$ conidias y $1,5 \cdot 10^5$ conidias/planta, respectivamente), y 2 (T1+T2)B (*Trichoderma saturnisporum* Ca1606 y *Trichoderma saturnisporum* a la dosis $5 \cdot 10^5$ conidias /planta) para observar las diferencias significativas entre dichos tratamientos (Anova LSD 95%).

Los resultados del ensayo mostraron que los mejores tratamientos para este índice fueron los codificados como 2T1A (*Trichoderma saturnisporum* a la dosis $1,5 \cdot 10^6$ conidias/planta), 2T2B (*Trichoderma saturnisporum* Ca1606 a la dosis $1,5 \cdot 10^5$ conidias/planta.) y 2 (T1+T2)B (*Trichoderma saturnisporum* y *T. saturnisporum* Ca1606 a la dosis $5 \cdot 10^5$ conidias /planta) (Figura 5).

Ejemplo 7

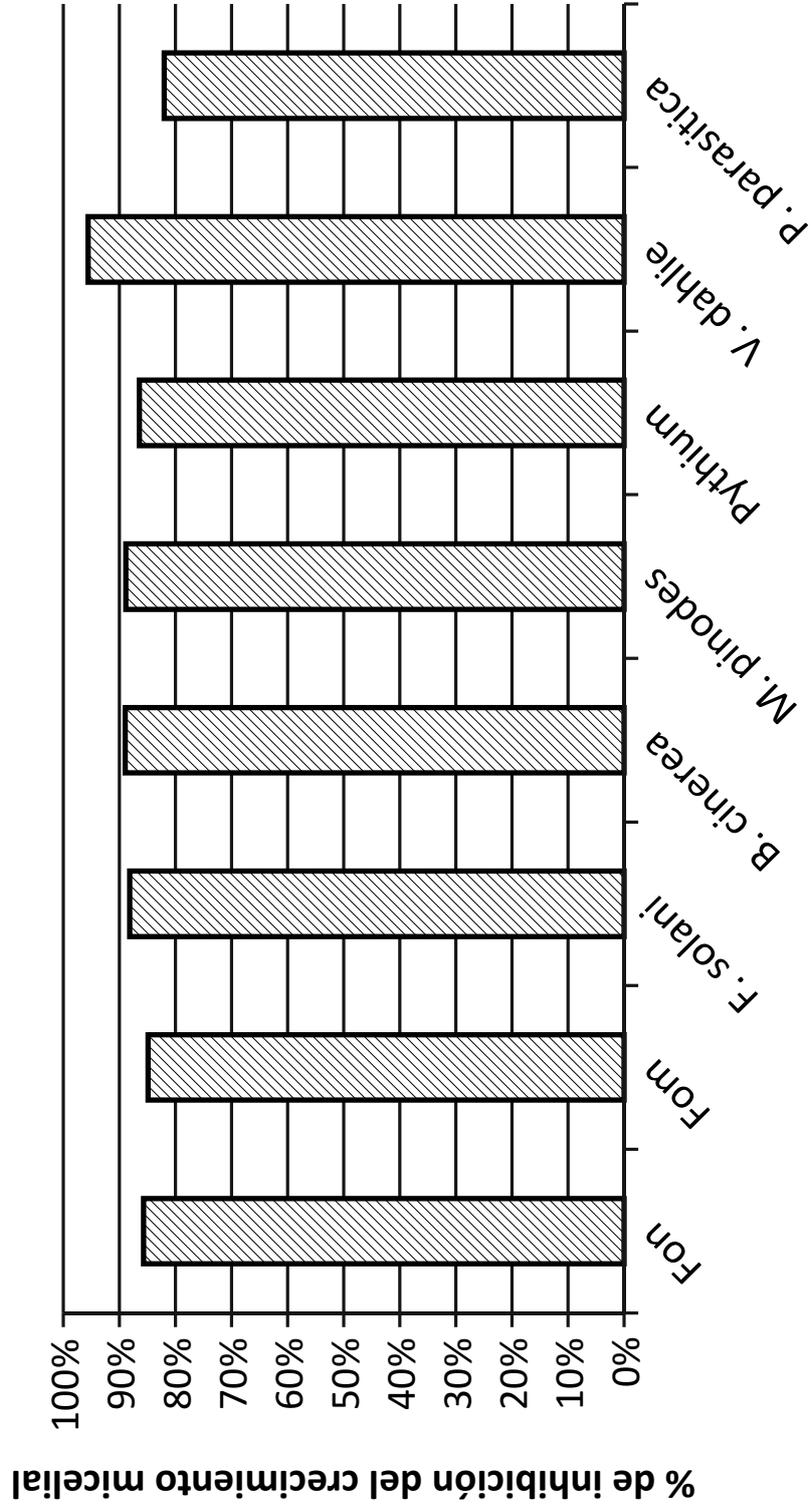
Se realizaron ensayos de inoculación en un cultivo comercial de melón cantoloup en invernadero. La inoculación se realizó mediante la aplicación en riego por goteo a una dosis de $4,5 \cdot 10^8$ esporas/mL en el suelo del invernadero. La aplicación de la cepa Ca1606 de *Trichoderma saturnisporum*, supuso un incremento en el peso del fruto (Figura 6) y el rendimiento (Figura 7) del mismo, comparando los tratamientos en los que se aplicó, con un producto comercial formulado a base de *Trichoderma harzianum*. (Tc) y de un testigo en el que no se realizó ninguna aplicación (To). Puede observarse como tanto el peso medio del fruto (g) como el rendimiento (Kg/ha) para el tratamiento inoculado con la cepa Ca1606 (T2) fue 7000 kg/ha mayor que el rendimiento en el tratamiento inoculado con el producto comercial (Tc), y unos 5000 kg/ha mayor que en el tratamiento testigo (To).

Ejemplo 8

Se realizó un ensayo de solarización enterrando fragmentos de tallo de tomate de 10 cm de longitud en dos fracciones correspondiente a suelo y arena en un suelo enarenado. Los tratamientos realizados fueron la aplicación de agua a saturación para el proceso de solarización (tratamiento testigo) y de agua con 10^8 conidias/mL de *Trichoderma saturnisporum* Ca1606. El ensayo se realizó durante 40 días y tras ellos se determinó el porcentaje de pérdida de peso de los fragmentos. La determinación del peso seco se estimó secando a 70°C fragmentos de la misma longitud paralelamente al ensayo. Tras la degradación, se secaron en estufa, y se determinó la pérdida de peso, con respecto al dato tomado previo al ensayo de solarización. Los resultados revelan que la incorporación de *Trichoderma saturnisporum* supone una degradación superior de los fragmentos, aproximadamente del doble, siendo superior la degradación en arena con respecto al suelo, en la que solo se incrementa el porcentaje ligeramente.

REIVINDICACIONES

1. Cepa Ca1606 de *Trichoderma saturnisporum* con número de depósito CECT nº 20781.
- 5 2. Composición fitosanitaria que comprende un cultivo biológicamente puro de la cepa de la reivindicación 1, o cualquier producto o microorganismo derivado del mismo, y un vehículo para su dispersión y/o multiplicación.
3. Composición según la reivindicación 2 donde el vehículo se selecciona de entre un sustrato o un medio sólido, líquido, coloidal o gelificado.
- 10 4. Composición según la reivindicación 3 donde el sustrato se selecciona de entre turba, fibra de coco, compost y combinaciones de los mismos.
5. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde la cepa Ca1606 se aplica en forma de conidias.
- 15 6. Composición según la reivindicación 5, donde la concentración de conidias está comprendida entre $1 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^{12}$ conidias/mL de la composición.
7. Uso de una composición según las reivindicaciones 2-6 para el control biológico de plagas.
8. Uso según la reivindicación 7 para el control de la Fusariosis Vascular.
9. Uso según la reivindicación 7 donde el patógeno responsable de la plaga se selecciona entre *Botrytis cinérea*, *Mycosphaerella pinodes*, *Pythium* sp, *Phytophthora parasítica*, *Fusarium solani* y *Verticillium dahliae*.
- 20 10. Uso de una composición según las reivindicaciones 2-6 para potenciar el crecimiento y/o producción de cultivos hortícolas o plantas.
11. Uso de una composición según las reivindicaciones 2-6 para la descomposición de materia orgánica.
- 25 12. Uso de la cepa de la reivindicación 1 para el control biológico de plagas.
13. Uso de la cepa de la reivindicación 1 para potenciar el crecimiento y/o producción de cultivos hortícolas o plantas.
- 30 14. Uso de la cepa de la reivindicación 1 para la descomposición de materia orgánica.



Patógeno

FIG. 1

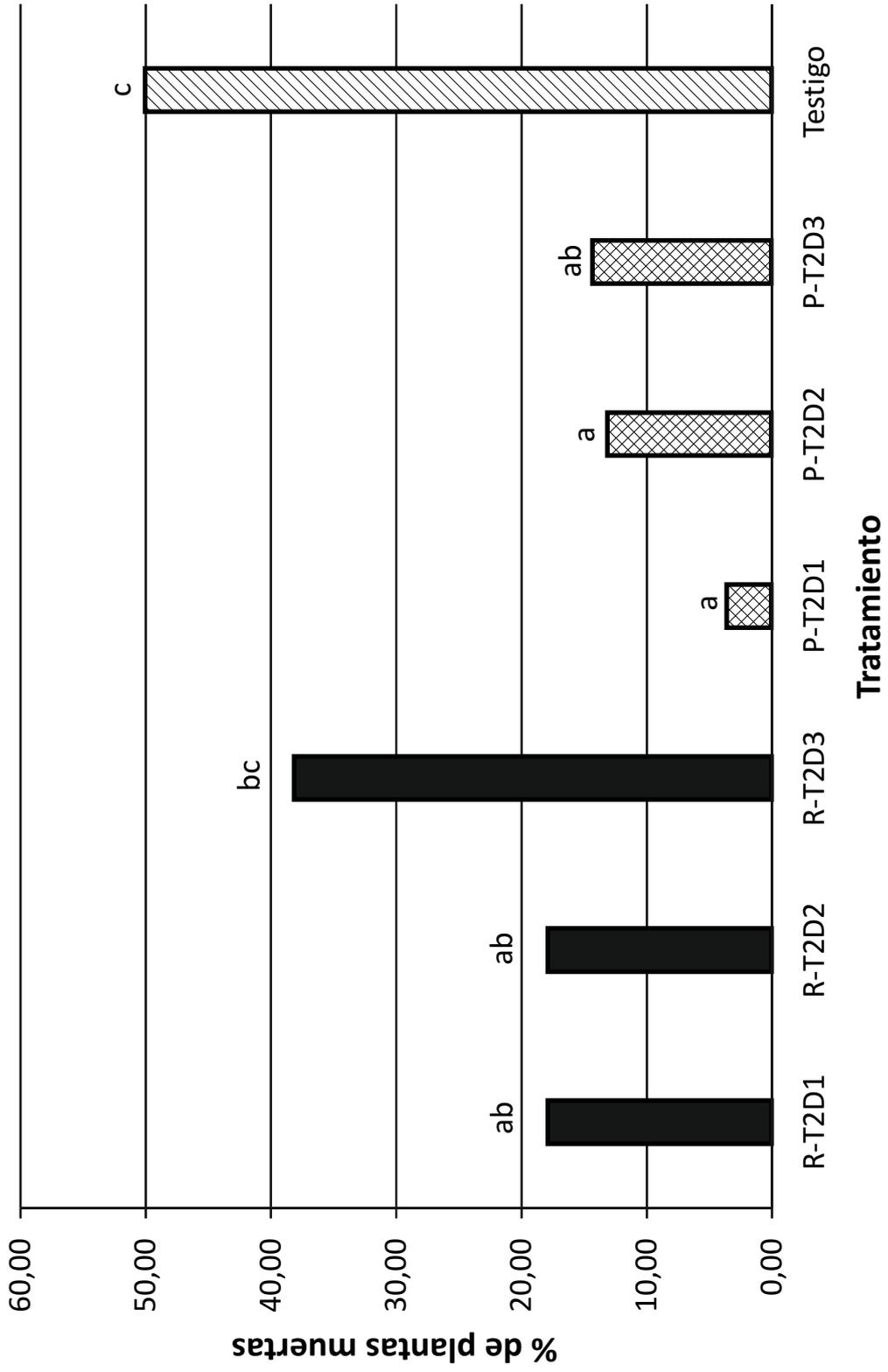


FIG. 2

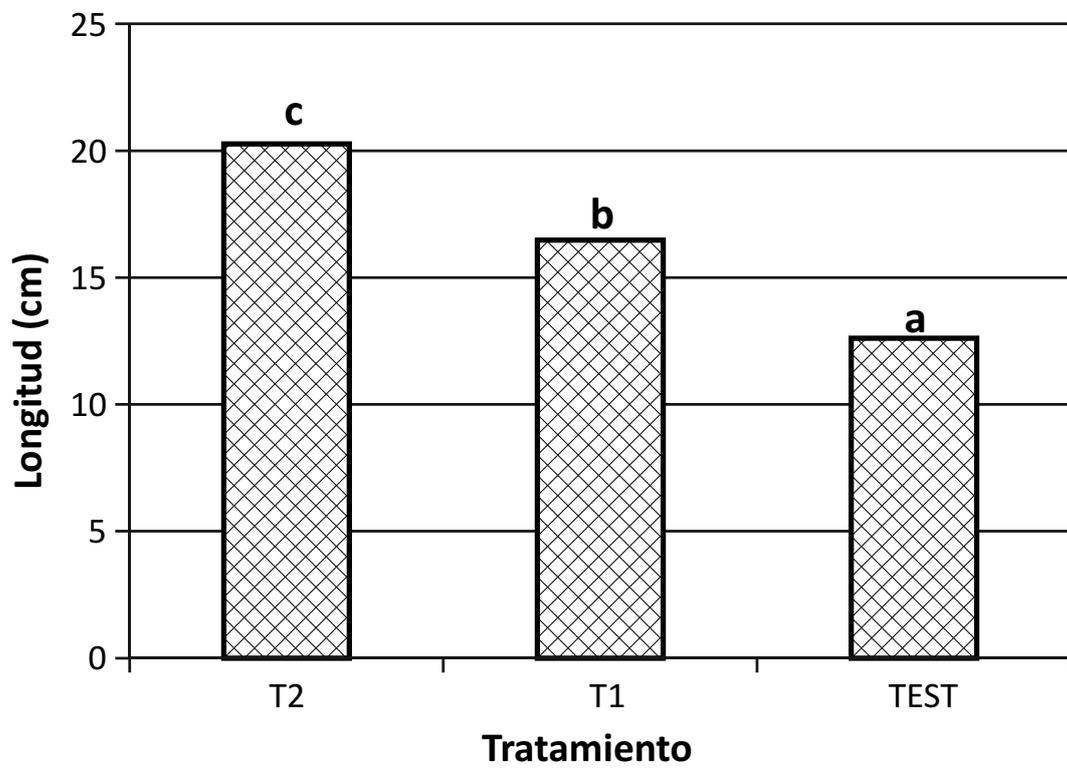


FIG. 3

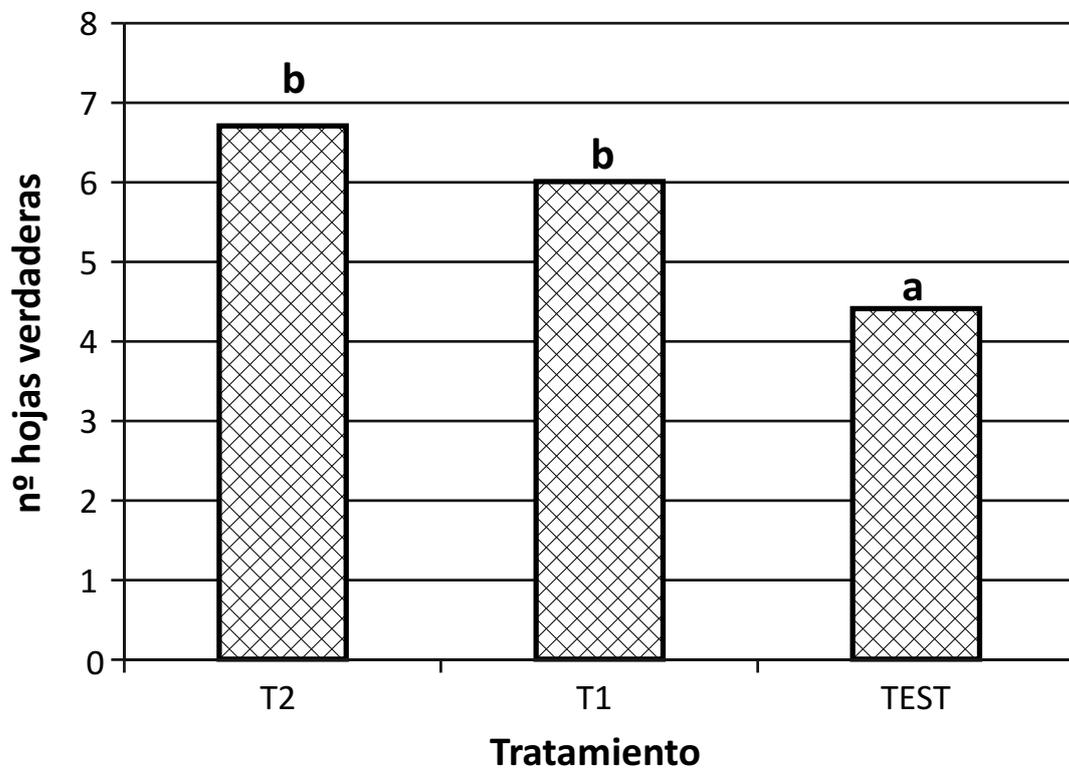


FIG. 4

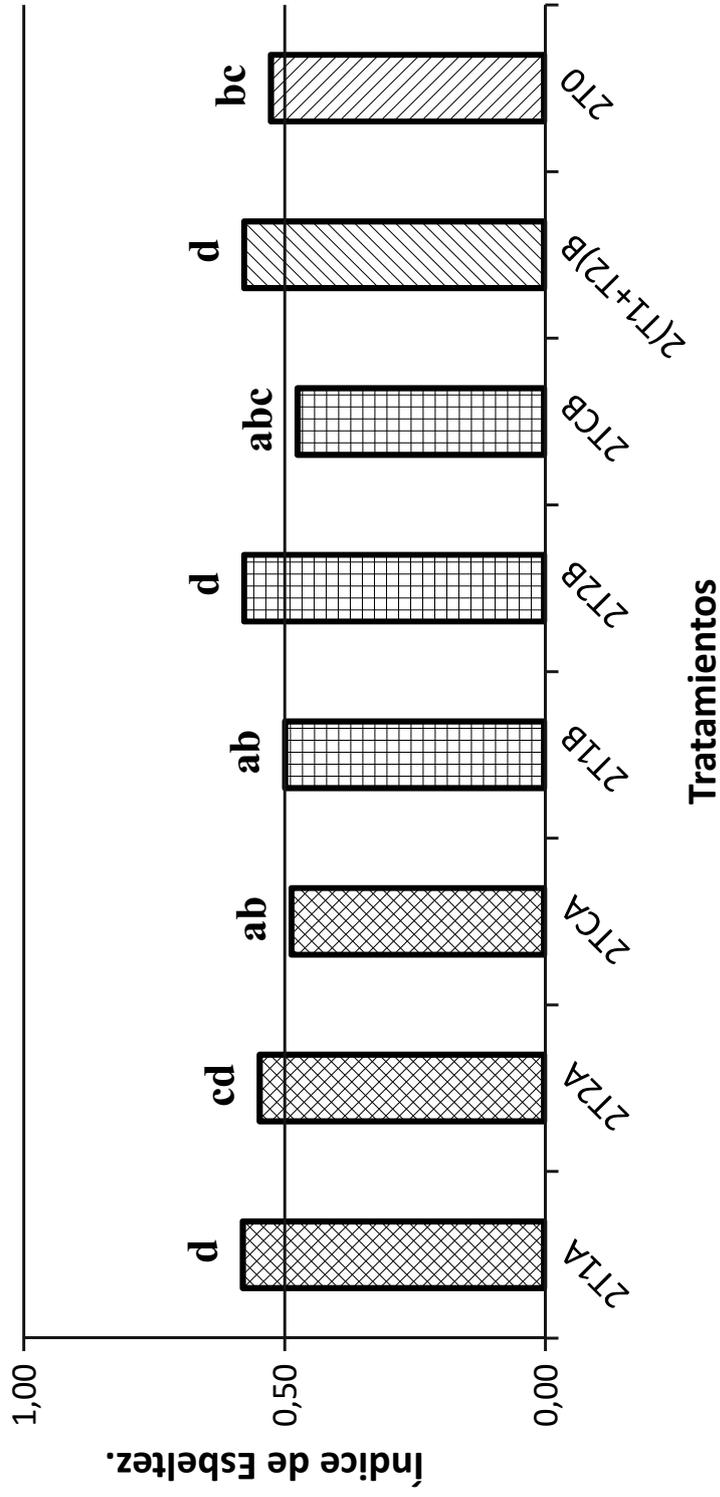


FIG. 5

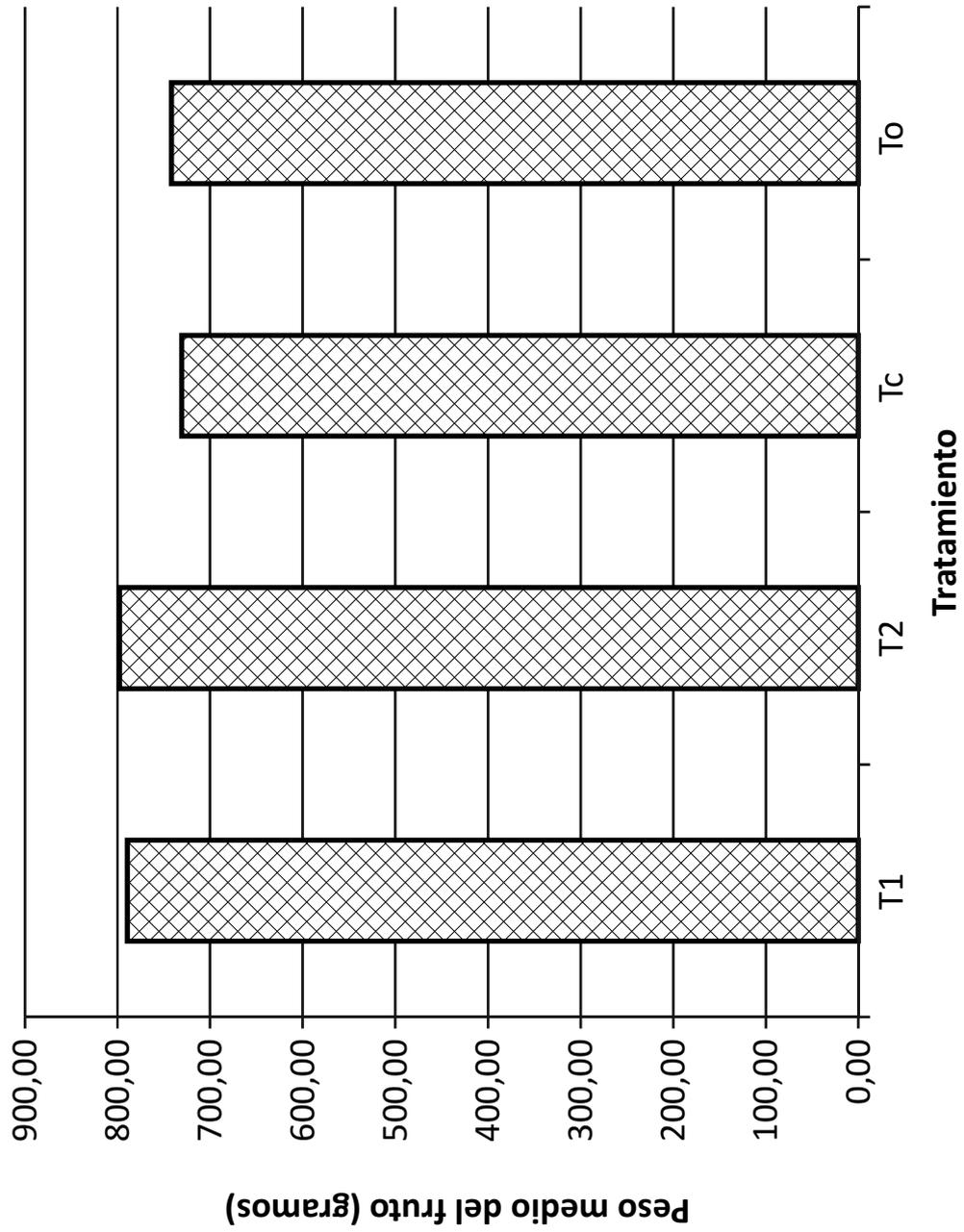


FIG. 6

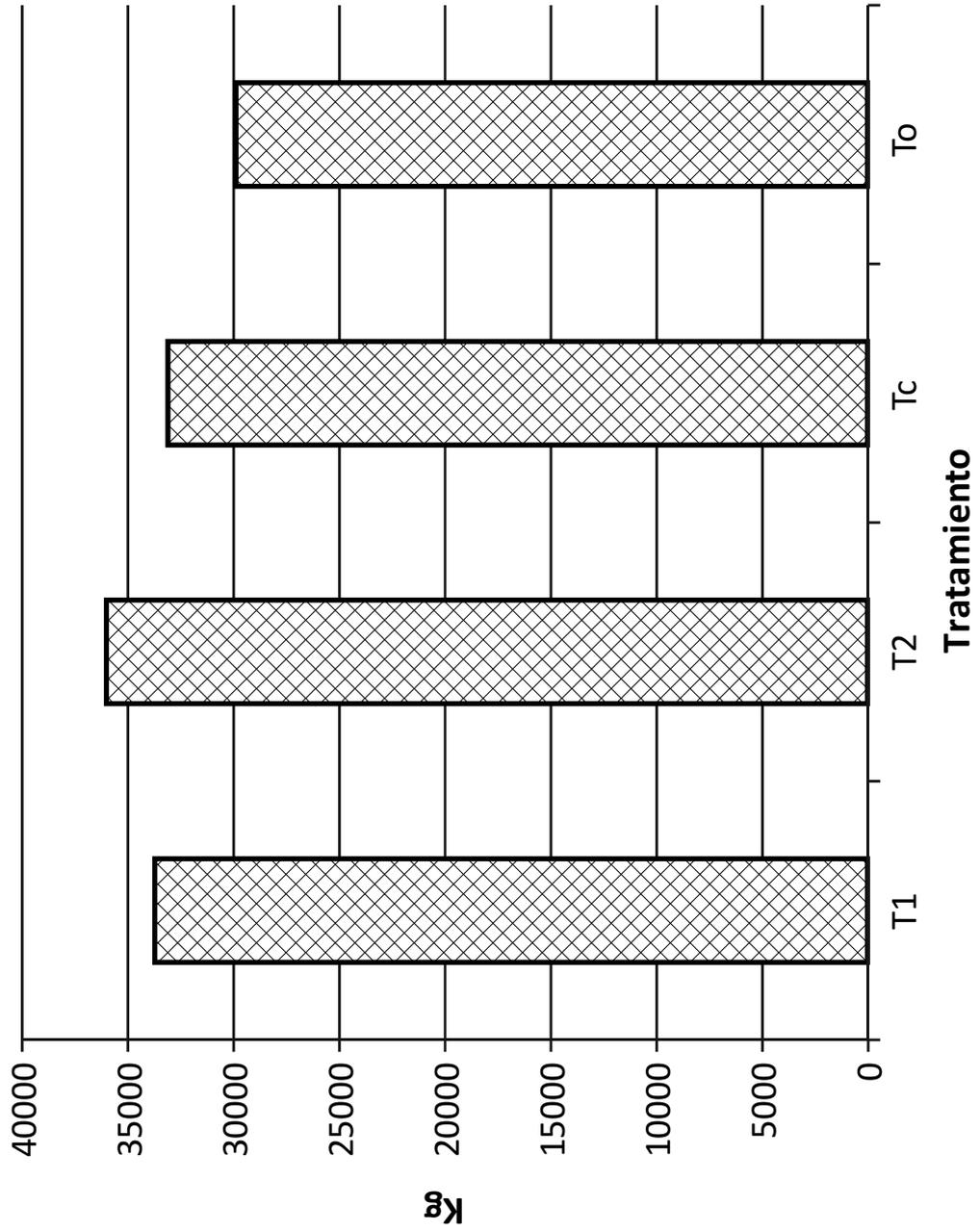
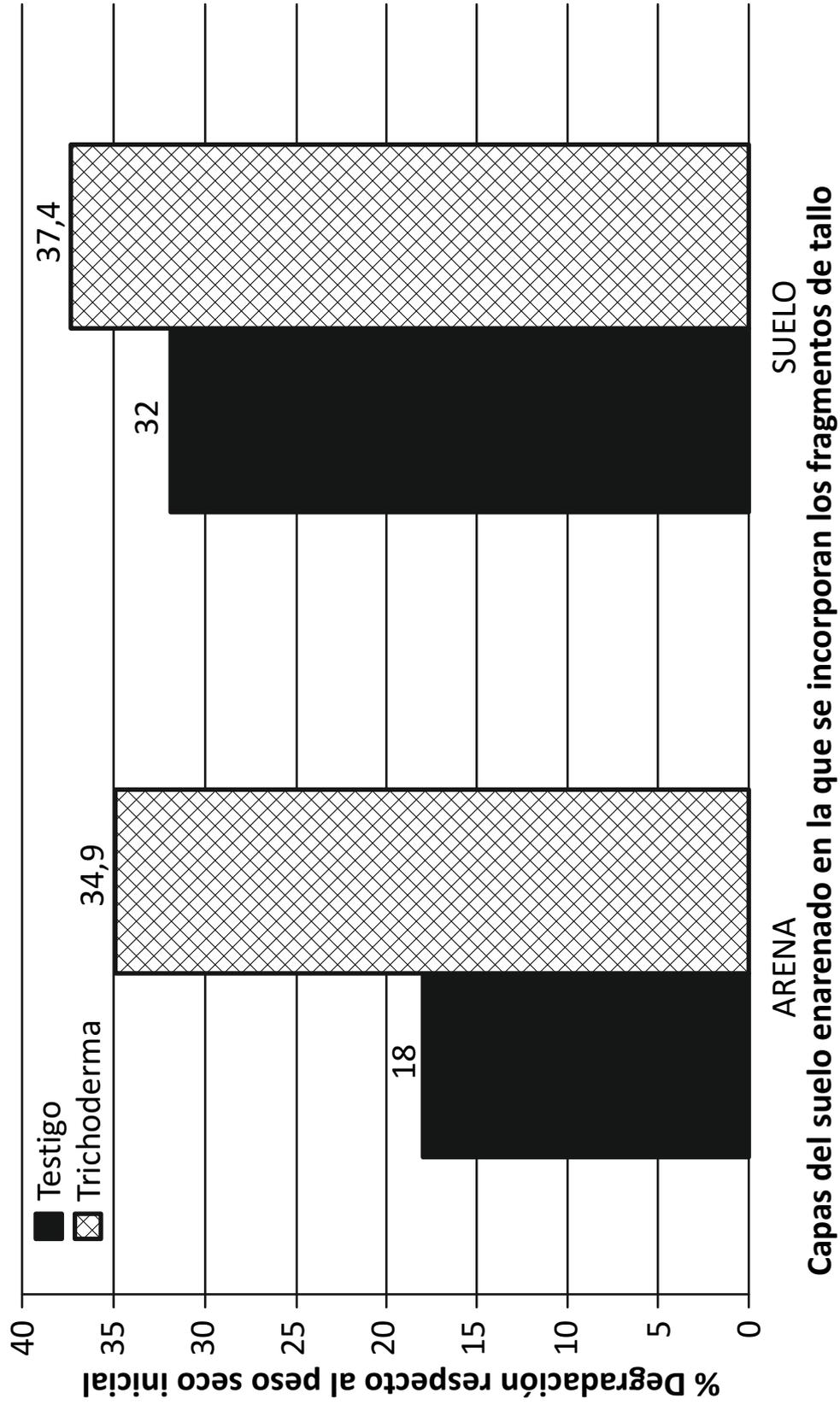


FIG. 7



Capas del suelo enarenado en la que se incorporan los fragmentos de tallo

FIG. 8

ES 2 411 807 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Almería

<120> NUEVA CEPA DE TRICHODERMA SATURNISPORUM, COMPOSICIONES Y APLICACIONES DE LA MISMA

<130> 242/11

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<223> cebador ITS1

<400> tccgtaggtg aacctgcgg 19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<223> cebador ITS4

<400> tcctccgctt attgatatgc 20

<210> 3

<211> 583

<212> DNA

<213> Trichoderma saturnisporum

<223> secuencia de la cepa Ca1606 obtenida empleando el cebador ITS1

<400>

```
gtgaacgttc caatctgttg cctcggcggg atctctgccc cgggcgcgct gcagccccgg 60
atcccatggc gcccgccgga ggaccaacca aactcttttt ctctctcgt cgcggctccg 120
tcgcggtctt gttttatttt tgctctgagc ctttctcggc gaccctagcg ggcgtctcga 180
aaatgaatca aaactttcaa caacggatct cttggttctg gcatcgatga agaacgcagc 240
gaaatgcgat aagtaatgtg aattgcagaa ttcagtgaat catcgaatct ttgaacgcac 300
attgcgcccc ccagtattct ggcgggcatg cctgtccgag cgtcatttca accctcgaac 360
ccctccgggg ggtcggcggt ggggatcggc cccctcaccg gggccgcccc cgaaatccag 420
tggcggcttc gccgcagcct ctctcgcgca gtagtttgca cactcgcacc gggagcgcgg 480
cgcggccaca gccgtaaaac accccaaact ctgaaatggt gacctcggat caggtaggaa 540
taccgctga acttaagcat nttatntgt ggnngnang aaa 583
```

<210> 4

<211> 570

<212> DNA

<213> Trichoderma saturnisporum

<223> secuencia de la cepa Ca1606 obtenida empleando el cebador ITS4

<400>

```
angtttgggngnnntcggctgngggccgcgcgcgctcccggtgcgagtgtgcaaactactgvcgagagag
ctgcggcgagaccgccactggatttcggggggcggcccggtgagggggcgcgatccccaacgccgacccccgg
aggggttcgaggggttgaaatgacgctcggacaggcatgcccgccagaatactggcgggvcgcaatgtgcgttca
```

ES 2 411 807 A1

aagattcgatgattcactgaattctgcaattcacattacttatcgatttcgctgcttcttcacgatgcca
gaaccaagagatccgttggtgaaagttttgattcattttcgagacgcccgtagggcgcgagaaaaggctca
gagcaaaaataaaacagagccgacgagccgacgagagagagaaaaagagtttggttggtcctccggcgg
gcgcatgggatccggggctgcgacgcgcccggggcagagatcccgcgaggcaacagattggtaacgttcac
attggggtttgggagttgtaaacctcggtaatgatccctcngggggnccccccncngg



②¹ N.º solicitud: 201132042

②² Fecha de presentación de la solicitud: 19.12.2011

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DE 102005026748 A1 (LUETH PETER) 19.07.2007	1-14
A	WIEDOW DENNY et al., "Inoculation with Trichoderma saturnisporum accelerates wheat straw decomposition on soil", Archives of Agronomy and Soil Science (2007), 53(1), pág. 1-12.	1-14
A	SHARMA V et al., "Purification and characterization of an extracellular 24 kDa chitobiosidase from the mycoparasitic fungus Trichoderma saturnisporum" J Basic Microbiol. 2012 Jun; 52(3):324-31. doi: 10.1002/jobm.201100145. Epub 2011 Sep 23.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
25.01.2013

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/14 (2006.01)

C12P1/02 (2006.01)

C12R1/885 (2006.01)

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

C12N, C12P, C12R

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

EPODOC WPI CAPLUS MEDLINE BIOSIS EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.01.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DE 102005026748 A1 (LUETH PETER)	19.07.2007
D02	WIEDOW DENNY et al., "Inoculation with <i>Trichoderma saturnisporum</i> accelerates wheat straw decomposition on soil", <i>Archives of Agronomy and Soil Science</i> (2007), 53(1), pág. 1-12.	
D03	SHARMA V et al., "Purification and characterization of an extracellular 24 kDa chitobiosidase from the mycoparasitic fungus <i>Trichoderma saturnisporum</i> " <i>J Basic Microbiol.</i> 2012 Jun; 52(3):324-31. doi: 10.1002/jobm.201100145. Epub 2011 Sep 23.	

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

La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Trichoderma saturnisporum* con número de depósito CECT nº 20781. Asimismo se refiere a una composición fitosanitaria que comprende dicha cepa y a su empleo para el control biológico de plagas, para potenciar el crecimiento y/o producción de cultivos hortícolas o plantas y para la descomposición de materia orgánica.

El documento D01 describe una preparación para promover la descomposición de la paja que comprende hongos de la especie *Trichoderma saturnisporum*.

La preparación comprende la cepa PBP-TH-001 (DSM 16989), una cepa mutante u otra cepa derivada de esta. La preparación, formulada con materiales auxiliares y portadores, contiene las conidias secas, esporas y / o fragmentos de hifas. El componente fúngico es la conidia de la cepa PBP-TH-001. La preparación es suspendible en agua y se aplica en el proceso de pulverización.

El documento D02 describe un estudio que investiga los efectos de la inoculación con el microhongo saprófito y potencial agente de biocontrol *Trichoderma saturnisporum* PBP-TH-001, aislado de un suelo cultivable en el norte de Alemania, en la descomposición de la paja del trigo. La descomposición de la paja se ha investigado indirectamente mediante un experimento de incubación aeróbica durante 13 semanas, y directamente por Py-FIMS. Los tratamientos comprendieron la adición de glucosa *T. saturnisporum*, y *T. saturnisporum* con glucosa. La respiración del suelo durante todo el período de incubación se incrementó significativamente por la inoculación con *T. saturnisporum*. La relación C / N de la paja inoculada disminuyó fuertemente desde un valor inicial de 76 a 43 después de 4 semanas y a 30 y después de 13 semanas. Los ensayos Py-FIMS mostraron que la inoculación con *T. saturnisporum* causó una disminución significativa en el contenido de esteroles de la paja después de 4 semanas. Por lo tanto, los resultados demostraron la contribución potencial de *T. saturnisporum* para acelerar la descomposición de paja de trigo en el suelo.

El documento D03 describe la purificación y caracterización de un quitobiosidasa extracelular de 24 kDa a partir del hongo *Trichoderma saturnisporum*. En particular, se utilizó la cepa GITX-Panog (C) que presenta una fuerte actividad antifúngica y quitinolítica contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, el agente causal de la marchitez vascular del clavel.

El análisis de homología de la secuencia parcial ITS mostró que la cepa GITX-Panog (C) estaba estrechamente relacionada con la cepa *T. saturnisporum* CBS 335.

1.- NOVEDAD

En opinión de esta Oficina, en ausencia de datos que comparen la cepa de la invención con las citadas en el Informe de Búsqueda, se considera que las reivindicaciones 1-14 son nuevas de acuerdo al Art. 6.1 LP 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

Los documentos D01 y D02 que describen la cepa PBP-TH-001 (DSM 16989) de *Trichoderma saturnisporum* se consideran el estado de la técnica más cercano a la invención. En este sentido el problema técnico planteado sería la provisión de una nueva cepa de la especie *Trichoderma saturnisporum*. La solución que aporta la invención de la presente solicitud es la cepa CECT nº 20781 de *Trichoderma saturnisporum*.

En ausencia de datos que comparen los resultados de la aplicación de la cepa de los documentos D01-2 y la cepa de la invención, esta Oficina considera que los efectos descritos en la solicitud no se derivan de forma evidente de ninguno de los dos documentos D01-2 tomados solos o en combinación. En este sentido, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-14 cumplen el requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP 11/1986.