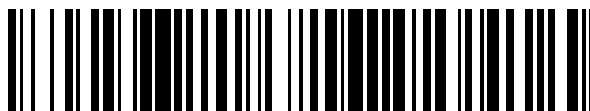


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 145**

51 Int. Cl.:

A01N 63/20 (2010.01)

A01N 63/32 (2010.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2016 PCT/CL2016/050064**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017 WO17088081**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2016 E 16867501 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2021 EP 3381288**

54 Título: **Gluconobacter cerinus más Hanseniaspora osmophila para el control de micosis en plantas y frutos**

30 Prioridad:

27.11.2015 CL 20153484

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.10.2021

73 Titular/es:

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO (100.0%)
Avenida Brasil, 2950 Oficina 4-28
Valparaíso, CL**

72 Inventor/es:

**BESOAIN CANALES, XIMENA ALEJANDRA;
CADIZ MORALES, FABIOLA FRANCISCA y
SALGADO VARAS, EDUARDO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 870 145 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Gluconobacter cerinus más Hanseniaspora osmophila para el control de micosis en plantas y frutos

5 **Antecedentes de la invención**

Se ha demostrado que las principales afecciones que afectan los frutos en pre y postcosecha son causadas por géneros de hongos correspondientes a *Rhizopus*, *Botrytis*, *Aspergillus* y *Penicillium*, los cuales tienen el potencial de producir distintos tipos de enfermedades, incluyendo las enfermedades denominadas pudrición de la vid y pudrición gris [1]. Para el control de patógenos fúngicos en plantas se han utilizado diversas estrategias, incluyendo el uso de compuestos químicos que son potencialmente perjudiciales para la salud humana, sin mencionar que pueden seleccionar cepas patógenas resistentes.

La exportación a mercados distantes de productos agrícolas perecibles supone importantes desafíos para que arriben en condiciones adecuadas y soporten su comercialización [2, 3]. Por ejemplo la uva es afectada principalmente por dos enfermedades, pudrición de la vid o pudrición ácida y pudrición gris, que causan las mayores pérdidas en el cultivo tanto en pre como en post cosecha.

Los principales factores que influyen en el índice de daño causado por pudrición de la vid al momento de la cosecha, 60 y 120 días post-almacenaje refrigerado, corresponden a la incidencia de oídio y una fertilización nitrogenada elevada, entre otros [2]. El oídio es una enfermedad donde el hongo *Uncinula necator* es capaz de ingresar en forma directa a la baya y producir microfisuras tanto en hojas como en los frutos durante la precosecha, y de esta forma permite el ingreso de otros patógenos que sólo ingresan a través de heridas, como *Rhizopus* spp., *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., potenciando la enfermedad que estos causan.

Para evitar las significativas pérdidas que pueden provocar estos patógenos, se han invertido numerosos recursos económicos para aumentar las aplicaciones de fungicidas sintéticos. Sin embargo, desde hace 25 años, el control químico de las enfermedades se ha dificultado debido al continuo desarrollo de resistencia por parte de los patógenos a los fungicidas sintéticos, independientemente de su modo de acción o combinación.

En Chile se han presentado casos de resistencia específica y otros más complejos como la resistencia multifármaco [4]. En el campo, la resistencia específica a ingredientes activos, como benzimidazoles, fenilcarbamatos y dicarboximidas, fue detectada poco después de su introducción [5].

En el año 2009 se presentó el primer informe del aislado de *Botrytis cinerea* con resistencia multifármaco en Chile [6]. Este tipo de resistencia está asociada al uso reiterado de fungicidas sintéticos de uso normal como fludioxinilo, ciprodinilo, pirimetanil y fenhexamida [4]. Por lo tanto, en Chile no sólo existe resistencia específica sino que hoy en día también existen casos más complejos como la resistencia multifármaco [4].

Debido a las razones antes expuestas, se ha puesto énfasis en el control biológico de patógenos vegetales mediante el uso de otros organismos que impidan o dificulten el desarrollo de patógenos, sin afectar la viabilidad del cultivo o la salud de los consumidores.

En este sentido, actualmente es posible encontrar numerosos artículos referentes al control biológico de enfermedades por patógenos vegetales, entre los cuales se destaca el uso de hongos filamentosos, levaduras o bacterias como agentes biocontroladores.

El primer control biológico de enfermedades de postcosecha se hizo en 1977 por Tronsmo y Dennis, donde se publicó que el uso del hongo *Trichoderma* servía para el control de pudrición gris en frambuesas [7]. *Trichoderma* es uno de los hongos más usados como biocontrolador de enfermedades fúngicas. De hecho, en Estados Unidos y en otros países se han patentado una serie de aislados y diversas formas de control de diferentes enfermedades fúngicas basadas en este hongo [8-16]. De acuerdo a los reportes encontrados para el biocontrol de patógenos mediante el uso de levaduras, destaca *Picchia guilliermondii*, una conocida levadura con efecto de control biológico. *Picchia* tiene efecto biocontrolador sobre *Rhizopus nigricans* en frutos de tomate en almacenaje. Esta levadura es capaz de activar las enzimas de defensa del fruto y además compite por el sitio y nutrientes [17]. La cepa M8 de *Picchia guilliermondii* fue reportada como potencial biocontrolador de *Botrytis cinerea* en manzanas bajo condiciones de almacenaje y en jugo de manzana. La levadura induce la respuesta de defensa del fruto, compite por nitrógeno, fuentes de carbono y secreta enzimas hidrolíticas [18]. La cepa Z1 de *Picchia guilliermondii* es usada en cítricos mezclados con ceras para el control de moho azul (*Penicillium italicum*). En jugo de naranja es capaz de inhibir la germinación de esporas. Su modo de acción es a través de la competencia por nutrientes [19].

La especie *Picchia caribbica* es capaz de controlar *Penicillium expansum* en manzanas. Sin embargo, con la aplicación de ácido ascórbico se mejora la tolerancia al estrés oxidativo de la levadura y por lo tanto se mejoraría el efecto sobre *Penicillium expansum* [20].

Algunos ésteres de acetato producidos por manzanas estimulan la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. Sin

embargo, este efecto puede ser suprimido con levaduras como *Cryptococcus laurentii*, *Sporobolomyces roseus* o *Saccharomyces cerevisiae*, siendo las dos primeras más efectivas en la supresión de la germinación de conidias [21]. Por otra parte, el butil acetato producido por las manzanas incrementa la adhesión de las conidias de *Botrytis cinerea*, estimulando su germinación. Sin embargo, *Cryptococcus laurentii* y *Sporobolomyces roseus* pueden reducir este efecto, no así *Saccharomyces cerevisiae*. Este hecho refuerza la necesidad de realizar búsquedas empíricas de cepas biocontroladoras eficaces [22].

Saccharomyces cerevisiae ha sido registrada en una serie de patentes como controlador biológico para diferentes enfermedades. Por ejemplo una composición y método fitosanitario a partir de dicha levadura para tratar o proteger plantas de enfermedades causadas por varios patógenos [23].

Otros géneros importantes de levaduras en el control biológico corresponden a *Rhodotorula* y *Metschnikowia*. Una serie de especies y aislados en formulaciones han sido registrados como método para el control de enfermedades de pre y postcosecha, en especial moho azul, pudrición gris, mucor y pudriciones de frutos [24]. Cepas de especies de *Metschnikowia* han sido registradas en patentes para el control del decaimiento de frutos causado por *Penicillium expansum* [1].

En cuanto al control biológico de enfermedades en uvas, podemos mencionar que *Candida sake CPA-1 plus Fungicover®*, *Ulocladium oudemansii* y quitosán son capaces de reducir significativamente la severidad de pudrición ácida, con 40 a 60 % de inhibición comparado con el control. Sin embargo la incidencia de la enfermedad no fue significativamente reducida por alguno de los tratamientos [25].

Por otra parte, *Candida saitoana*, junto a una composición de otras especies de este género más enzimas, han sido registrados como control biológico para enfermedades de plantas, en especial para enfermedades de postcosecha [26].

Además, 16 aislados de *Saccharomyces* y 27 aislados correspondientes a levaduras distintas de *Saccharomyces* mostraron propiedades antagonistas sobre algunos de los hongos patógenos a 25 °C [27]. En otro trabajo realizado por los mismos autores, se recolectó un total de 225 aislados de levaduras provenientes de uvas, suelo de viñedos y mosto de uva para ser evaluados sobre el control de *Botrytis cinerea*. Los 65 aislados correspondieron a 15 especies que inhibieron a *Botrytis cinerea* a 25 °C en condiciones *in vitro*. Sólo uno de estos aislados, *Saccharomyces cerevisiae* BSc68, inhibió el crecimiento micelial en uvas a 2 y 25 °C. Todos los aislados determinados con actividad antifúngica provenían de mosto en fermentación [28].

Por otro lado, entre los reportes encontrados para el biocontrol de patógenos mediante el uso de bacterias, encontramos *Bacillus subtilis*, una de las bacterias más estudiadas como biocontrol. *Bacillus subtilis* corresponde a una cepa nativa aislada de suelos del centro de México y que ha sido reportada como biocontrolador de *Sporisorium reilianum* en maíz en tratamientos aplicados a semillas [29]. Al igual que en el caso de los hongos de biocontrol, han sido concedidas una serie de patentes de diferentes aislados de *Bacillus* utilizados para el control de varias enfermedades en plantas [30-39].

Otro género muy estudiado son las *Pseudomonas*. Las cepas CCR04 y CCR80 de *Pseudomonas corrugata* han demostrado ser muy efectivas en la colonización de raíces de pimiento. De esta manera pueden inhibir la infección por *Phytophthora capsici* en el cultivo [40]. *Pseudomonas aeruginosa*, por su parte, produce metabolitos con actividad antibiótica capaz de controlar las enfermedades causadas por *Xanthomonas* spp., por lo que podría ser una alternativa a los bactericidas convencionales usados para su control [41]. Además, se ha reportado que las bacterias *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia plymuthica*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis* y *Bacillus polymyxa* han sido registradas para el control de *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicola* en repollo [42].

En Chile las bacterias *Serratia plymuthica* CCGG2742 fue aislada desde bayas de uvas y registrada como patente en Estados Unidos para el control de enfermedades de vegetales, en particular para prevenir la infección de *Botrytis cinerea* en frutos susceptibles de ser infectados [43].

Las bacterias ácido acéticas (BAA), por otra parte, son de especial interés biotecnológico en los procesos industriales involucrados en la producción de celulosa, sorbosa y vinagre. La familia es conocida como *Acetobacteraceae* y cuenta con 12 géneros [44]. El género *Gluconobacter*, uno de los más comunes entre las *Acetobacteraceae*, incluye 14 especies de las cuales 5 son usadas en la manufactura de alimentos, principalmente porque son inofensivas para la salud humana [45]. Estas bacterias son estrictamente aeróbicas, quimioorganótrofas y Gram-negativas. Crecen entre 4 y 40 °C con un óptimo de 30 °C y un pH óptimo de 5 a 6 [46]. Viven en la superficie de vegetales y frutos principalmente como saprofitos simbiotes. En bacterias aisladas a partir de frutos y flores en Tailandia, se encontraron 45 aislados del género *Gluconobacter*. De estos, 17 cepas correspondieron a *Gluconobacter oxydans*, 12 cepas a *Gluconobacter cerinus*, 9 cepas a *Gluconobacter frateurii* y 6 cepas a *Gluconobacter thailandicus* [47]. En una colecta realizada desde uvas con pudrición en tres viñedos de Adelaide Hills (Australia del Sur), se encontraron 9 especies diferentes de bacterias ácido acéticas, entre las cuales, 4 especies correspondieron al género *Gluconobacter*. *Gluconobacter cerinus* fue la principal especie identificada en los mencionados viñedos [48]. En uvas podridas o infectadas con *Botrytis* spp., el número de bacterias ácido acéticas se incrementa drásticamente, pasando de unas

pocas a alrededor de 1×10^6 [UFC/ml] después de la infección por *Botrytis* spp. [49]. Cuando esto ocurre, las especies de BAA pueden comenzar a dominar.

5 Actualmente, casi no existen reportes de bacterias del género *Gluconobacter* en control biológico. Sin embargo, se ha reportado el uso de *Gluconobacter oxydans* con actividad antifúngica y antipatulina en jugo de manzana [45]. La bacteria fue aislada desde la superficie de frutos de manzana y, en condiciones *in vitro*, fue capaz de reducir en un 42,3 % el diámetro del crecimiento micelial de *Penicillium expansum*. Por otra parte, se mostró un alto nivel de eficiencia y completa prevención en la acumulación de patulina en jugo de manzana.

10 Para evitar el desarrollo de enfermedades en frutos y hojas provocadas por patógenos fúngicos, se recurre frecuentemente al empleo de fungicidas sintéticos o tratamientos en base a productos naturales y/o biológicos. Los fungicidas sintéticos son eficaces, pero dificultan la exportación a mercados más exigentes debido a los efectos potencialmente perjudiciales en animales y plantas. Los fungicidas biológicos, por su parte, pueden ser más inocuos y más aceptados en distintos mercados, aunque en la actualidad se ha observado que no presentan buenos niveles de eficacia, sobre todo cuando se comparan con fungicidas sintéticos. A la luz de estos antecedentes, se hace obvia la necesidad de desarrollar nuevos fungicidas biológicos con actividades antimicóticas mejoradas.

20 Guzzon R. *et al.* (2014, European Food Research and Technology, 239(1): 117-126) da a conocer que *Gluconobacter cerinus* T9 es capaz de controlar el crecimiento de *Botrytis cinerea*.

Aun cuando se han desarrollado y patentado en varios países numerosos procedimientos de control biológico antifúngico, actualmente son muy pocos los que se usan de forma práctica en la agricultura. Esto se debe, por una parte, a la alta exigencia de calidad e inocuidad de los productos requeridos por los mercados internacionales y, por otra, a que los biocontroladores propuestos no alcanzan la efectividad que se requiere para cumplir las normativas comerciales de los diversos países. Esto provoca que los productores y exportadores necesariamente recurran a los productos sintéticos, los cuales se encuentran bajo estrictos controles por parte de las buenas prácticas agrícolas (BPA) y son objeto de exigentes fiscalizaciones en los mercados de destino. Además, la opinión pública los considera poco amigables con la salud humana y con el medio ambiente.

30 Por estas razones se hace necesario contar con un producto biológico y/o natural capaz de controlar en forma eficaz los principales agentes causantes de enfermedades en la pre y postcosecha de frutos y/o plantas, que no genere problemas de restricciones de comercialización en mercados de destino, que no presente resistencia, que sea compatible con el almacenaje y transporte refrigerado, amigable con el medio ambiente y seguro para la salud humana.

35 **Breve descripción de la invención**

La presente invención está dirigida a productos biológicos para el control de enfermedades fúngicas vegetales y usos de los mismos.

40 La invención abarca un producto biológico para el control de enfermedades fúngicas en vegetales que comprende una combinación de bacterias de *Gluconobacter cerinus* cepa 515 con código de acceso RGM2215, depositada en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos a una concentración entre 1×10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/ml] y 1×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/ml] y *Hanseniaspora osmophila* cepa 337 con código de acceso RGM2214, depositada en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos a una concentración entre 1×10^4 unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/ml] y 1×10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/ml].

50 También se da a conocer un método para preparar el producto biológico para el control de enfermedades fúngicas vegetales, donde tal método comprende mezclar en bacterias 1×10^6 [UFC/ml] de *Gluconobacter* y al menos 1×10^4 [UFC/ml] de *Hanseniaspora*, preferentemente de 1×10^6 [UFC/ml] a 1×10^8 [UFC/ml] de *Gluconobacter* y de 1×10^4 [UFC/ml] a 1×10^6 [UFC/ml] de *Hanseniaspora*.

55 Por consiguiente, en una realización el producto biológico para el control de enfermedades fúngicas vegetales comprende bacterias de *Gluconobacter cerinus* 515 a una concentración de 1×10^6 [UFC/ml] y levadura de *Hanseniaspora osmophila* 337 a una concentración de 1×10^4 [UFC/ml].

También se da a conocer un método para el control de enfermedades fúngicas vegetales que comprende administrar un producto biológico que contiene bacterias del género *Gluconobacter* y una levadura del género *Hanseniaspora* a un organismo vegetal.

60 En otro aspecto, la invención abarca el uso de un producto biológico según la invención para tratar, prevenir, controlar o curar enfermedades fúngicas en plantas. En una realización, las enfermedades susceptibles de ser tratadas, prevenidas, controladas o curadas por el uso del producto de la presente invención incluye enfermedades fúngicas producidas por *Deuteromycota*, comprendiendo enfermedades producidas por *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Botrytis* spp., entre otras. Además, la presente invención puede usarse para tratar, prevenir, controlar o curar enfermedades fúngicas en plantas producidas por *Zygomycota*, incluyendo *Rhizopus*, entre otros. Adicionalmente, el

producto de la invención puede utilizarse en plantas frutales como vides, pomáceas, prunus, cítricos y bayas; hortalizas de fruto como tomate, pimentón, berenjena, zapallo italiano; y hortalizas de hojas como lechugas, acelgas y espinacas.

5 Finalmente, el producto biológico de la invención se puede usar para tratar, prevenir, controlar o curar la pudrición ácida o pudrición de la vid, y la pudrición gris, entre otras enfermedades fúngicas.

Breve descripción de los dibujos

10 Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción más particular de métodos preferidos de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos. Según la invención *Gluconobacter cerinus* 515 y *Hanseniaspora osmophila* 337 se usan en el producto biológico. Otros microorganismos o combinaciones de microorganismos son solo de referencia.

15 La figura 1 muestra una gráfica de tratamiento frente a diámetro de lesión (cm), donde se observa el efecto del tratamiento con *Gluconobacter cerinus* (G.c.) (cepa 515 y 516) y/o *Hanseniaspora osmophila* (H.o.) (cepa 336 y 337) sobre el desarrollo de *Rhizopus* spp. en bayas de uva cv Red Globe. Las barras representan el diámetro de lesión generada por la infección de *Rhizopus* spp. en bayas de uva frente a los distintos tratamientos. La figura muestra los efectos a los 4 (A) y 15 (B) días después de la infección con el hongo patógeno. Las concentraciones de *Gluconobacter cerinus* (cepa 515 y 516) utilizadas son: dosis alta (1×10^8 [UFC/ml]) y dosis baja (1×10^6 [UFC/ml]). Las concentraciones de *Hanseniaspora osmophila* (cepa 336 y 337) utilizadas son: dosis alta (1×10^6 [UFC/ml]) y dosis baja (1×10^4 [UFC/ml]). La concentración utilizada para *Hanseniaspora osmophila* (cepa 336 y 337) en los tratamientos 2 y 3, es dosis alta. La concentración utilizada para *Gluconobacter cerinus* (cepa 515 y 516) en tratamientos 4 y 5, es dosis alta C. Las bayas de uva fueron inoculadas con 1×10^5 [esporas/ml] de *Rhizopus* spp. El control positivo corresponde al tratamiento de agua + *Rhizopus* spp. (lesión completa) y el control negativo corresponde al tratamiento de agua + agua (ausencia de lesión). Las letras a la derecha de las barras corresponden a distintas categorías de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

30 La figura 2 muestra una gráfica de tratamiento frente a diámetro de lesión (cm), donde se observa el efecto del tratamiento con *Gluconobacter cerinus* (G.c.) (cepa 515 y 516) y/o *Hanseniaspora osmophila* (H.o.) (cepa 336 y 337) sobre el desarrollo de *Botrytis cinerea* en bayas de uva cv Red Globe. Las barras representan el diámetro de lesión generada por la infección de *Botrytis cinerea* en bayas de uva frente a los distintos tratamientos. La figura muestra los efectos a los 4 (A) y 15 (B) días después de la infección con el hongo patógeno. Las dosis son las mismas que las descritas para la figura 1. El control positivo corresponde al tratamiento de agua + *Botrytis cinerea* (lesión completa) y el control negativo corresponde al tratamiento de agua + agua (ausencia de lesión). Las letras a la derecha de las barras corresponden a distintas categorías de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

40 La figura 3 muestra una gráfica de tratamiento frente a diámetro de lesión (cm), donde se observa el efecto del tratamiento con *Gluconobacter cerinus* (G.c.) (cepa 515 y 516) y/o *Hanseniaspora osmophila* (H.o.) (cepa 336 y 337) sobre el desarrollo de *Aspergillus* spp. en bayas de uva cv Red Globe. Las barras representan el diámetro de lesión generada por la infección de *Aspergillus* spp. en bayas de uva frente a los distintos tratamientos. La figura muestra los efectos a los 4 (A) y 15 (B) días después de la infección con el hongo patógeno. Las dosis son las mismas que las descritas para la figura 1. El control positivo corresponde al tratamiento de agua + *Aspergillus* spp. (lesión completa) y el control negativo corresponde al tratamiento de agua + agua (ausencia de lesión). Las letras a la derecha de las barras corresponden a distintas categorías de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

45 La figura 4 muestra una gráfica de tratamiento frente a diámetro de lesión (cm), donde se observa el efecto del tratamiento con *Gluconobacter cerinus* (G.c.) (cepa 515 y 516) y/o *Hanseniaspora osmophila* (H.o.) (cepa 336 y 337) sobre el desarrollo de *Penicillium* spp. en bayas de uva cv Red Globe. Las barras representan el diámetro de lesión generada por la infección de *Penicillium* spp. en bayas de uva frente a los distintos tratamientos. La figura muestra los efectos a los 4 (A) y 15 (B) días después de la infección con el hongo patógeno. Las dosis son las mismas que las descritas para la figura 1. El control positivo corresponde al tratamiento de agua + *Penicillium* spp. (lesión completa) y el control negativo corresponde al tratamiento de agua+ agua (ausencia de lesión). Las letras a la derecha de las barras corresponden a distintas categorías de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

55 La figura 5 muestra una gráfica de tratamiento frente a diámetro de lesión (cm), donde se observa el efecto del tratamiento con distintas concentraciones (dosis) de *Gluconobacter cerinus* (G.c.) cepa 515 y *Hanseniaspora osmophila* (H.o.) cepa 337 sobre el desarrollo de *Rhizopus* spp. en bayas de uva cv Red Globe. Las barras representan el diámetro de lesión generada por la infección de *Rhizopus* spp. en bayas de uva frente a las distintas realizaciones de la invención. La figura muestra los efectos a los 4 (A) y 20 (B) días después de la infección con el hongo patógeno. Las concentraciones de *Gluconobacter cerinus* (cepa 515) utilizadas son: dosis alta (1×10^8 [UFC/ml]) y dosis baja (1×10^6 [UFC/ml]). Las concentraciones de *Hanseniaspora osmophila* (cepa 337) utilizadas son: dosis alta (1×10^6 [UFC/ml]) y dosis baja (1×10^4 [UFC/ml]). Para el tratamiento 2, se usaron dosis bajas para *Gluconobacter cerinus* y *Hanseniaspora osmophila*. Las bayas de uvas fueron inoculadas con 1×10^5 [esporas/ml] *Rhizopus* spp. El control positivo corresponde al tratamiento de agua + *Rhizopus* spp. (lesión completa) y el control negativo corresponde al tratamiento de agua + agua (ausencia de lesión). Las letras a la derecha de las barras corresponden a distintas categorías de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

La figura 6 muestra una gráfica de tratamiento frente a diámetro de lesión (cm), donde se observa el efecto del tratamiento con distintas concentraciones (dosis) de *Gluconobacter cerinus* (G.c.) cepa 515 y *Hanseniaspora osmophila* (H.o.) cepa 337 sobre el desarrollo de *Botrytis cinerea* en bayas de uva cv Red Globe. Las barras representan el diámetro de lesión generada por la infección de *Botrytis cinerea* en bayas de uva frente a distintas realizaciones de la invención. La figura muestra los efectos a los 4 (A) y 20 (B) días después de la infección con el hongo patógeno. Las dosis son las mismas que las descritas para la figura 5. El control positivo corresponde al tratamiento de agua + *Botrytis cinerea* (lesión completa) y el control negativo corresponde al tratamiento de agua+ agua (ausencia de lesión). Las letras a la derecha de las barras corresponden a distintas categorías de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

La figura 7 muestra una gráfica de tratamiento frente a diámetro de lesión (cm), donde se observa el efecto del tratamiento con distintas concentraciones (dosis) de *Gluconobacter cerinus* (G.c.) cepa 515 y *Hanseniaspora osmophila* (H.o.) cepa 337 sobre el desarrollo de *Aspergillus* spp. en bayas de uva cv Red Globe. Las barras representan el diámetro de lesión generada por la infección de *Aspergillus* spp. en bayas de uva frente a distintas realizaciones de la invención. La figura muestra los efectos a los 4 (A) y 20 (B) días después de la infección con el hongo patógeno. Las dosis son las mismas que las descritas para la figura 5. El control positivo corresponde al tratamiento de agua + *Aspergillus* spp. (lesión completa) y el control negativo corresponde al tratamiento de agua+ agua (ausencia de lesión). Las letras a la derecha de las barras corresponden a distintas categorías de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

La figura 8 muestra una gráfica de tratamiento frente a diámetro de lesión (cm), donde se observa el efecto del tratamiento con distintas concentraciones (dosis) de *Gluconobacter cerinus* (G.c.) cepa 515 y *Hanseniaspora osmophila* (H.o.) cepa 337 sobre el desarrollo de *Penicillium* spp. en bayas de uva cv Red Globe. Las barras representan el diámetro de lesión generada por la infección de *Penicillium* spp. en bayas de uva frente a distintas realizaciones de la invención. La figura muestra los efectos a los 4 (A) y 20 (B) días después de la infección con el hongo patógeno. Las dosis son las mismas que las descritas para la figura 5. El control positivo corresponde al tratamiento de agua + *Penicillium* spp. (lesión completa) y el control negativo corresponde al tratamiento de agua+ agua (ausencia de lesión). Las letras a la derecha de las barras corresponden a distintas categorías de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

La figura 9 muestra una gráfica de tratamiento frente a diámetro de lesión (cm), donde se compara el efecto del producto biológico de la invención y un tratamiento estándar comercial sobre la incidencia (A y C) y severidad (B y D) de la pudrición de la vid (patología producida por *Rhizopus* spp., *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp., y/o *Penicillium* spp.) en uvas de mesa cv Red Globe que presentaban heridas (A y B) o que no las presentaban (C y D). En cada experimento se analizaron 10 racimos distintos, cada uno con 10 bayas. Las barras representan el porcentaje de uvas con síntomas en el racimo analizado (A y C) o el diámetro de lesión generada por la infección en la uva provocada por la pudrición de la vid (B y D). Los datos fueron obtenidos a los 5 días después de la infección, y a una incubación de 24 °C. La concentración de *Gluconobacter cerinus* (G.c.) cepa 515 fue de 1×10^6 [UFC/ml] y la de *Hanseniaspora osmophila* (H.o.) cepa 337 fue de 1×10^4 [UFC/ml]. El estándar comercial fue Switch ® 62.5 wg que viene formulado: Ciprodinilo (37,5 % en p/p) más Fludioxinilo (25 % en p/p). El control corresponde a uvas de mesa cv Red Globe sin tratamiento. Las letras a la derecha de las barras corresponden a distintas categorías de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

La figura 10 muestra una gráfica de tratamiento frente a diámetro de lesión (cm), donde se compara del efecto del producto biológico de la invención y un tratamiento estándar comercial sobre la incidencia (A y C) y severidad (B y D) de la pudrición gris (patología producida por *Botrytis cinerea*) en uvas de mesa cv Red Globe que presentaban heridas (A y B) o que no las presentaban (C y D). En cada experimento se analizaron 10 racimos distintos, cada uno con 10 bayas. Las barras representan el porcentaje de uvas con síntomas en el racimo analizado (A y C) o el diámetro de lesión generada por la infección en la uva provocada por la pudrición gris (B y D). Los datos fueron obtenidos a los 5 días después de la infección, y a una incubación de 24 °C. Las dosis son las mismas que las descritas para la figura 9. El estándar comercial fue Switch ® 62.5 wg que viene formulado: Ciprodinilo (37,5 % en p/p) más Fludioxinilo (25 % en p/p). El control corresponde a uvas de mesa cv Red Globe sin tratamiento. Las letras a la derecha de las barras corresponden a distintas categorías de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

La figura 11 muestra una gráfica de tratamiento frente a diámetro de lesión (cm), donde se compara del efecto del producto biológico de la invención y un tratamiento estándar comercial sobre la incidencia (A y C) y severidad (B y D) de la pudrición de la vid (patología producida por *Rhizopus* spp., *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp., y/o *Penicillium* spp.) en uvas de mesa cv Red Globe luego de un choque de frío. Se evaluaron uvas que presentaban heridas (A y B) y uvas que no las presentaban (C y D). Las barras representan el porcentaje de uvas con síntomas en el racimo analizado (A y C) o el diámetro de lesión generada por la infección en la uva provocada por la pudrición de la vid (B y D). Los datos fueron obtenidos a los 5 días después de la infección, y a una incubación de 0 °C, seguido por 6 días a temperatura ambiente. Las dosis son las mismas que las descritas para la figura 9. El estándar comercial fue Switch ® 62.5 wg que viene formulado: Ciprodinilo (37,5 % en p/p) más Fludioxinilo (25 % en p/p). El control corresponde a uvas de mesa cv Red Globe sin tratamiento. Las letras a la derecha de las barras corresponden a distintas categorías de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

La figura 12 muestra una gráfica de tratamiento frente a diámetro de lesión (cm), donde se compara el efecto del producto biológico de la invención y un tratamiento estándar comercial sobre la incidencia (A y C) y severidad (B y D) de la pudrición gris (patología producida por *Botrytis cinerea*) en uva de mesa cv Red Globe luego de un choque de frío. Se evaluaron uvas que presentaban heridas (A y B) y uvas que no las presentaban (C y D). Las barras representan el porcentaje de uvas con síntomas en el racimo analizado (A y C) o el diámetro de lesión generada por la infección en la uva provocada por la pudrición gris (B y D). Los datos fueron obtenidos a los 5 días después de la infección, y a una incubación de 0 °C, seguido por 6 días a temperatura ambiente. Las dosis son las mismas que las descritas para la figura 9. El estándar comercial fue Switch ® 62.5 wg que viene formulado: Ciprodinilo (37,5 % en p/p) más Fludioxinilo (25 % en p/p). El control corresponde a uvas de mesa cv Red Globe sin tratamiento. Las letras a la derecha de las barras corresponden a distintas categorías de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un producto biológico (es decir, composición) para el control de enfermedades fúngicas en plantas que comprende una combinación de bacterias de *Gluconobacter cerinus* cepa 515 con código de acceso RGM2215, depositada en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos a una concentración entre 1×10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/ml] y 1×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/ml] y *Hanseniaspora osmophila* cepa 337 con código de acceso RGM2214, depositada en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos a una concentración entre 1×10^4 unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/ml] y 1×10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/ml]. Estos microorganismos fueron aislados desde bayas provenientes de racimos de uva de mesa, cosechados en predios con producción comercial destinada a la exportación.

Los inventores encontraron que, sorprendentemente, las bacterias *Gluconobacter* de la invención tiene un efecto antifúngico evidente en hongos de distintos tipos, incluyendo *Rhizopus* spp., *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. Más sorprendentemente aún, los inventores observaron que la adición de la levadura *Hanseniaspora* potenciaba sinérgicamente el efecto antifúngico de *Gluconobacter*. Este efecto no se puede desprender de la mera lectura del estado del arte ya que no hay documentos que divulguen que *Hanseniaspora osmophila* tenga actividad antifúngica, ni mucho menos que potencie sinérgicamente la actividad antifúngica de *Gluconobacter*.

Por otra parte, el producto biológico de la invención (es decir, *Gluconobacter cerinus* 515 + *Hanseniaspora osmophila* 337) exhibe un efecto antifúngico sostenido en el tiempo, incluso varios días después de la inoculación. Además, el efecto antifúngico obtenido con el producto biológico de la invención es tanto o más efectivo que los efectos obtenidos con antifúngicos sintéticos, incluso en condiciones de choques y cadenas de frío, tan comunes en los embalajes de frutos y verduras para su conservación. Por todas estas razones, el producto biológico antifúngico de la invención es eficaz y no presenta las desventajas de los productos antifúngicos sintéticos.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un producto antifúngico que comprende *Gluconobacter cerinus* 515 y *Hanseniaspora osmophila* 337, que presenta un efecto sorprendentemente sinérgico y potenciado de la actividad antifúngica. Además, es tanto o más eficaz que compuestos antifúngicos sintéticos, pero es un producto natural, solucionando un problema de la técnica que no ha sido resuelto satisfactoriamente al presente.

A continuación sigue una descripción de realizaciones preferidas de la invención.

Las palabras “un” o “una” se pretende que abarquen uno/a o más, a menos que se especifique lo contrario.

La invención se refiere a un producto biológico que comprende una bacteria del género *Gluconobacter cerinus* y una levadura de *Hanseniaspora osmophila*. *Gluconobacter* spp. se puede cultivar en medio de cultivo GYC (glucosa 50 [g/l], extracto de levadura 10 [g/l], carbonato de calcio 30 [g/l], agar 25 [g/l], ácido clorhídrico 2 [N] y agua destilada 1 l) a 25 °C. Además, cualquier otra forma de cultivo adecuada para *Gluconobacter* spp. será útil para el propósito de esta invención. Por su parte, *Hanseniaspora* spp. se puede cultivar en medio de cultivo MLP (peptona 20 [g/l], miel de abejas 80 [g/l], agar 20 [g/l], agua destilada 1 l) a 25 °C. Al igual que para *Gluconobacter* spp., cualquier otra forma de cultivo adecuada para *Hanseniaspora* spp. será útil para el propósito de la presente invención.

Para obtener el producto de la presente invención, es necesario mezclar *Gluconobacter cerinus* 515 con código de acceso RGM2215, depositada en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos, con *Hanseniaspora osmophila* cepa 337 con código de acceso RGM2214, depositada en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos. Los microorganismos deberán mezclarse en una proporción de 1×10^6 [UFC/ml] a 1×10^8 [UFC/ml] de *Gluconobacter cerinus* 515 y de 1×10^4 [UFC/ml] a 1×10^6 [UFC/ml] de *Hanseniaspora osmophila* 337. Para poder estimar el número de UFC, se podrá utilizar el método de conteo de microorganismos viables en placa, o algún otro método adecuado para tal efecto. Para poder mezclar los microorganismos de la invención, estos podrán estar suspendidos en medio de cultivo (como los descritos en los párrafos precedentes) o en cualquier otro vehículo adecuado, como por ejemplo suero fisiológico (NaCl 0,85 %), amortiguador fosfato (PBS), agua peptonada, agua con agar, o agua estéril. Alternativamente, los microorganismos de la invención pueden mezclarse liofilizados o liofilizarse después de ser mezclados.

Se da a conocer un método para el control de enfermedades fúngicas en plantas que a su vez comprende administrar el producto biológico a un organismo vegetal. Para administrar el producto biológico de la invención se puede realizar directamente sobre las plantas, incluyendo sobre los tallos, hojas, frutos y brotes. Alternativamente, el producto de la invención puede agregarse directamente sobre la tierra de cultivo, ya sea mezclado con las aguas de riego o por sí solo. Alternativamente, el producto de la invención puede agregarse sobre semillas antes de ser almacenadas o antes de ser plantadas. Para administrar el producto de la invención, cualquier medio es adecuado, incluyendo administraciones en vehículos líquidos (chorro directo, pulverización, mezclado con aguas de riego) o directamente como polvo en el caso de usarse liofilizado. El uso de medios con consistencia de gel o espuma para contener el producto biológico descrito en la presente solicitud también está considerado dentro del ámbito de la protección de la presente invención.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del producto biológico con propiedades antifúngicas de la invención para tratar, prevenir, controlar o curar enfermedades fúngicas en plantas. Por consiguiente, la presente invención incluye el uso profiláctico del producto sobre tallos, hojas, frutos y semillas sanos, e incluso sobre la tierra que será cultivada. Además, se incluye el uso del producto de la invención sobre tallos, hojas, frutos y semillas que presenten cualquier síntoma de enfermedad.

En una realización, enfermedades susceptibles de ser tratadas, prevenidas o curadas por el uso del producto de la presente invención incluye enfermedades fúngicas provocadas por *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Botrytis* spp., entre otras. Además, la presente invención puede usarse para tratar, prevenir, controlar o curar enfermedades fúngicas en plantas producidas por *Zygomycota*, incluyendo *Rhizopus*, entre otros. Adicionalmente, el producto de la invención puede utilizarse en plantas frutales como vides, pomáceas, prunus, cítricos y bayas; hortalizas de fruto como tomate, pimentón, berenjena, zapallo italiano; y hortalizas de hojas como lechugas, acelgas y espinacas.

Finalmente, el producto biológico de la invención se puede usar para tratar, prevenir, controlar o curar la pudrición ácida o pudrición de la vid y la pudrición gris, entre otras enfermedades fúngicas.

La invención se comprenderá mejor por medio de los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Según la invención, *Gluconobacter cerinus* 515 y *Hanseniaspora osmophila* 337 se usan en el producto biológico. Otros microorganismos o combinaciones de microorganismos son solo de referencia.

Ejemplo 1: Preparación del producto biológico de la invención y protocolos de ensayos biológicos.

A.- Preparación de *Gluconobacter cerinus* (cepa 515 y 516)

La bacteria se cultivó en el medio de cultivo GYC (glucosa 50 [g/l], extracto de levadura 10 [g/l], carbonato de calcio 30 [g/l], agar 25 [g/l], ácido clorhídrico 2 [N], completar 1 l con agua destilada) durante 5 días a 25 °C. Una vez crecida, la bacteria se extrajo desde el medio de cultivo y se diluyó en agua más agar al 1 % y tween al 20 % para romper la tensión superficial, dejando las bacterias a la concentración adecuada (tabla 1). Las bayas de uva se inocularon con 10 µl de la suspensión bacteriana. Como control negativo, se usaron 10 µl de agua en vez de *Gluconobacter*.

Tabla 1. Concentraciones utilizadas para inocular vegetales

Microorganismo	Concentración
<i>Gluconobacter cerinus</i>	1x10 ⁸ [UFC/ml] (Dosis alta)
	1x10 ⁶ [UFC/ml] (Dosis baja)
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	1x10 ⁶ [UFC/ml] (Dosis alta)
	1x10 ⁴ [UFC/ml] (Dosis baja)
Hongo patógeno	1x10 ⁵ [esporas/ml]

B.- Preparación de *Hanseniaspora osmophila* (cepa 336 y 337)

La levadura se cultivó en el medio de cultivo MLP (peptona 20 [g/l], miel de abejas 80 [g/l], agar 20 [g/l], completar 1 l con agua destilada) durante 5 días a 25 °C. Una vez crecida, la levadura se extrae desde el medio de cultivo y se diluye en agua más agar al 1 % y tween al 20 % para romper la tensión superficial, dejando las levaduras a la concentración adecuada (tabla 1). Las bayas de uva se inocularon con 10 µl de la suspensión de levaduras. Como control negativo, se usaron 10 µl de agua en vez de *Hanseniaspora*.

C.- Preparación del producto biológico que comprende *Gluconobacter* y *Hanseniaspora*.

Para preparar el producto de la invención, se mezclaron volúmenes de solución concentrada con *Gluconobacter* y otra

solución concentrada de *Hanseniaspora*. Para lograr la concentración deseada, de acuerdo a la tabla 1, se realizó el cálculo de $C1 * V1 = C2 * V2$, donde C1 es la concentración inicial de la solución; V1 es el volumen inicial de la solución; C2 es la concentración final de la solución y V2 es el volumen final de la solución. Así se tomó un volumen de solución según el resultado del cálculo y se diluyó mezclando *Gluconobacter* y *Hanseniaspora* en una sola solución.

Las bayas de uva se inocularon con 10 µl de la suspensión microbiológica. Como control negativo, se usaron 10 µl de agua en vez de producto biológico.

D.- Infección con los hongos patógenos *Rhizopus* spp., *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp. y/o *Penicillium* spp.

Los hongos patógenos *Rhizopus* spp., *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp. y/o *Penicillium* spp. se cultivaron en medio PDA 39 [g/l] Difco™ durante 7 días a 24 °C para *Rhizopus* spp., *Aspergillus* spp. y/o *Penicillium* spp. y durante 10 días a 24 °C, bajo luz negra (320 nm) para *Botrytis cinerea*. Luego, 10 µl (1×10^5 [esporas/ml]) (tabla 1) se utilizaron para inocular las bayas de uva. Como control negativo, se usaron 10 µl de agua en vez de suspensión de esporas de hongos patógenos.

E.- Preparación de antifúngico sintético comercial de uso estándar (Ciprodinilo + Fludioxinilo).

Ciprodinilo + fludioxinilo corresponde al producto comercial Switch® 62.5 wg que viene formulado: Ciprodinilo 37,5 % en p/p + Fludioxinilo 25 % en p/p. La dosis aplicada fue de 10 µl (90 g por cada 100 l de agua).

F.- Determinación del efecto antifúngico.

Para determinar el efecto antifúngico del producto biológico de la presente invención y de sus controles, se infectaron bayas de uvas cv Red Globe con hongos patógenos de acuerdo a lo indicado en el punto D, concomitantemente con la adición de las composiciones antifúngicas de acuerdo a los puntos A, B, C o E. En el caso de las figuras 1 a 8, las bayas infectadas se incubaron durante 4 días a 24 °C, y los días subsiguientes hasta completar 15 o 20 días, a temperatura ambiente. En el caso de las figuras 9 y 10, las bayas infectadas se incubaron 5 días a 24 °C. En el caso de las figuras 11 y 12, las bayas infectadas se incubaron 5 días a 0 °C y luego 6 días a temperatura ambiente. Para las figuras 9A, 9B, 10A, 10B, 11A, 11B, 12A y 12B, se analizaron bayas con o sin heridas. Las heridas, de aproximadamente 2 mm de profundidad, se realizaron en las bayas de uva por los investigadores.

El efecto antifúngico se determinó después de la incubación, midiendo el diámetro de las lesiones producidas por los hongos patógenos (estimación de la severidad) o calculando el porcentaje de bayas afectadas en un racimo dado (índice de la incidencia).

Ejemplo 2: *Gluconobacter* spp. y *Hanseniaspora* spp. presentan un efecto antifúngico sinérgico contra *Rhizopus* spp., *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.

Con el objetivo de determinar el efecto antifúngico de *Gluconobacter* y *Hanseniaspora*, se realizó un desafío utilizando *Rhizopus* spp. (figura 1), *Botrytis cinerea* (figura 2), *Aspergillus* spp. (figura 3) o *Penicillium* spp. (figura 4) como hongos patógenos. Los hongos patógenos se cultivaron y se usaron para infectar bayas de uvas cv Red Globe según se explicó en el ejemplo 1. Al mismo tiempo de la infección, se agregó agua (tratamiento de control negativo), *Hanseniaspora osmophila* sola (cepa 336 o cepa 337), *Gluconobacter cerinus* sola (cepa 515 o cepa 516), o una combinación de *Gluconobacter* y *Hanseniaspora* en distintas concentraciones (tabla 1). El efecto antifúngico se estimó como el diámetro de lesión después de 4 días (figuras 1 A, 2A, 3A, 4A) o después de 15 días después de la infección (figuras 1B, 2B, 3B, 4B). El experimento se repitió 3 veces (replicado biológico) y cada vez se analizaron 5 bayas distintas. Los resultados permitieron la categorización de los tratamientos de acuerdo a análisis estadísticos (prueba de Tukey $p \leq 0,05$).

Según nuestros resultados, se observa claramente que a los 4 días después de la infección, ninguna de las cepas de *Hanseniaspora osmophila* es capaz de disminuir los diámetros de las lesiones producidas por *Rhizopus* spp. (figura 1 A). Por otra parte, se observa que las dos cepas de *Gluconobacter cerinus* sometidas a prueba ejercieron un efecto significativo en la disminución de las lesiones producidas por *Rhizopus* spp., donde *Gluconobacter cerinus* cepa 515 ejerció un efecto levemente superior al efecto de la cepa 516 (figura 1A). Más importantemente, el producto biológico de la invención (el cual comprende *Gluconobacter cerinus* + *Hanseniaspora osmophila*) presenta un claro efecto potenciado sinérgico en relación al efecto obtenido por sus partes individuales (figura 1A). Esto queda de manifiesto en el hecho de que *Hanseniaspora osmophila* evidentemente mejora las propiedades antifúngicas de *Gluconobacter cerinus*, aun cuando *Hanseniaspora osmophila* por sí sola no tiene efecto antifúngico contra *Rhizopus* spp. (figura 1A). El producto de la invención ejerce, además, un efecto antifúngico potenciado contra *Botrytis cinerea* (figura 2A), *Aspergillus* spp. (figura 3A) y contra *Penicillium* spp. (figura 4A). El efecto sinérgico potenciado del producto biológico de la invención es especialmente evidente para el tratamiento de *Penicillium* spp., donde *Hanseniaspora osmophila* y *Gluconobacter cerinus* exhiben un débil efecto antifúngico por sí solos, el cual se observa claramente incrementado y mejorado cuando ambos microorganismos se mezclan (figura 4A).

A la luz de estos resultados es posible concluir que *Hanseniaspora* potencia sinérgicamente los efectos antifúngicos

de *Gluconobacter*. Por tanto, el producto biológico de la invención presenta un efecto sorprendente, imposible de determinar sin los datos empíricos divulgados en la presente solicitud.

Ejemplo 3: Distintas concentraciones de *Gluconobacter* spp. y *Hanseniaspora* spp. presentan un efecto antifúngico sinérgico contra *Rhizopus* spp., *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. sostenido en el tiempo.

Con el objetivo de averiguar si el efecto antifúngico producido por la presente invención es sostenido en el tiempo, se realizó un desafío como el descrito en el ejemplo 2, pero evaluando el tamaño de las lesiones después de 15 días después de la infección. Como se observa en las figura 1B, 2B, 3B y 4B, la presente invención aún mantiene sus propiedades antifúngicas contra *Rhizopus* spp., *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. incluso 15 días después de la inoculación.

Con el objetivo de averiguar el efecto de las concentraciones (es decir, UFC/ml) de *Gluconobacter* y *Hanseniaspora* con respecto a la eficiencia del producto biológico de la invención como antifúngico, se realizó otro desafío de acuerdo a lo que se explicó en el ejemplo 1, pero esta vez sometiendo a prueba concentraciones distintas de *Gluconobacter* y *Hanseniaspora* (tabla 1). De acuerdo a lo observado en las figuras 5 a 8, el producto biológico de la invención ejerce un efecto antifúngico eficaz contra *Rhizopus* spp., *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., tanto a los 4 como a los 20 días después de la infección. Más importantemente, las figuras 5 a 8 muestran que, independientemente de las concentraciones de bacterias y levadura, siempre se observa un biocontrol eficaz y de larga duración de las lesiones producidas por patógenos fúngicos.

Con estos resultados concluimos que el producto biológico de la invención ejerce un eficaz efecto antifúngico incluso 20 días después de su aplicación. Además, los efectos antifúngicos no se ven afectados en gran medida por la concentración de bacteria o de levadura usada.

Ejemplo 4: El producto de la invención es tanto o más eficaz que antifúngicos comerciales sintéticos.

Con el objetivo de comparar la eficacia antifúngica del producto biológico de la invención con antifúngicos comerciales sintéticos, se realizó un desafío utilizando bayas de uva cv Red Globe las que fueron inoculadas con los agentes causales de la pudrición de la vid (figura 9) o la pudrición gris (figura 10). Se analizaron y compararon bayas con heridas (figuras 9A, 9B, 10A, 10B) o sin ellas (figuras 9C, 9D, 10C, 10D) para evaluar si esta variable afectaba al efecto antifúngico de la presente invención. Una combinación de *Gluconobacter* y *Hanseniaspora*, o un antifúngico sintético comercial que comprende Cipronidilo + Fludioxinilo, fue administrado de acuerdo a lo indicado en el ejemplo 1 a las bayas infectadas. Después de 5 días a 24° C, el efecto antifúngico en la incidencia se estimó como el porcentaje de frutos afectados en un racimo dado (figuras 9A, 9C, 10A, 10C) y en la severidad como el diámetro de lesión (figuras 9B, 9D, 10B, 10D). En cada experimento se analizaron 10 racimos distintos, cada uno con 10 bayas. Los resultados permitieron la categorización de los tratamientos de acuerdo a análisis estadísticos (prueba de Tukey $p \leq 0,05$).

Según nuestros resultados, se observa que el producto biológico de la presente invención es tan eficaz como el tratamiento sintético estándar en disminuir los signos de la pudrición de la vid (pudrición ácida) o la pudrición gris cuando la planta no ha sufrido heridas (figuras 9C, 9D, 10C, 10D). De manera más importante, el producto biológico de la presente invención es incluso más eficaz que el estándar sintético en disminuir los diámetros de las lesiones provocadas por hongos patógenos cuando los vegetales han sufrido previamente heridas (figuras 9A, 9B, 10A, 10B), demostrando un efecto sorprendente de la combinación de *Gluconobacter* y *Hanseniaspora* en la disminución de la severidad de infecciones adquiridas a través de heridas.

A partir de estos datos concluimos que el producto biológico de la presente invención es tanto o más eficaz que productos antifúngicos sintéticos comerciales. Además, el producto biológico de esta invención tiene un claro efecto en la disminución de la severidad de infecciones adquiridas a través de heridas, efecto que no se observa tan eficazmente con el antifúngico sintético comercial. Este aspecto claramente representa una ventaja de la presente invención con respecto al estado de la técnica.

Ejemplo 5: El producto de la invención es tanto o más eficaz que antifúngicos comerciales en presencia de bajas temperaturas.

Un aspecto importante a considerar es, si el producto biológico de la invención tolera la exposición a bajas temperaturas y si persiste su efecto cuando se somete a temperatura ambiente después de un período de refrigeración (condiciones normales para proceso de comercialización). Con el fin de averiguar si la presente invención mantiene su eficacia a lo largo del tiempo después de un choque de frío, realizamos el mismo desafío que el descrito en el ejemplo 4, con la excepción de que las bayas infectadas fueron incubadas primeramente 5 días a 0 °C y luego 6 días a temperatura ambiente antes de evaluar la incidencia y la severidad de la enfermedad de la misma manera a la descrita en el ejemplo 4.

Los resultados indicaron que el producto biológico de la invención es tanto o más eficaz que el antifúngico sintético, incluso después de haber pasado por el choque frío (figuras 11 y 12). El efecto antifúngico del producto biológico de la invención es especialmente bueno contra la pudrición gris en presencia de heridas (figura 12) en las condiciones

probadas, reforzando el efecto protector de heridas que ejercen la combinación de *Gluconobacter* y *Hanseniaspora*.

Según estos resultados, concluimos que el producto biológico de la invención mantiene su eficacia incluso en presencia de choques de frío. Además, la eficacia de la presente invención con respecto a la disminución de la incidencia y severidad de enfermedades vegetales producidas por hongos es incluso superior a la obtenida con compuestos antifúngicos sintéticos.

Referencias

- 10 1. Janisiewicz, W., *Biological control of postharvest decay of fruit using strains of Metschnikowia species* 2006, Los Estados Unidos de América representados por el Departamento de Agricultura, Washington, DC (EE. UU.): Estados Unidos. págs. 1-16.
- 15 2. Rendich, A., E. Salgado, y X. Besoain, *Análisis multifactorial para determinar condiciones predisponentes a pudrición del racimo en uva cv. Red Globe*. 2005, XV Congreso Nacional de Fitopatología: Arica, Santiago. Chile.
3. Esterio, M., et al., *First Report of Fenhexamid Resistant Isolates of Botrytis cinerea on Grapevine in Chile*. 2007, Plant Disease. págs. 768.
- 20 4. Leroux, P. y A.S. Walker, *Activity of fungicides and modulators of membrane drug transporters in field strains of Botrytis cinerea displaying multidrug resistance*. European Journal of Plant Pathology, 2013. 135: págs. 683-693.
5. Pommer, E.H. y G. Lorenz, *Resistance of Botrytis cinerea Pers. to dicarboximide fungicides*. Crop Protection, 1982. 1(2): págs. 221-230.
- 25 6. Latorre, B. y R. Torres, *Prevalence of isolates of Botrytis cinerea resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards*. Crop Protection, 2012. 40: págs. 49-52.
7. Tronsmo, A. y C. Dennis, *The use of Trichoderma species to control strawberry fruit rots*. 1977, Neth. J. Pl. Patho. págs. 449-455.
- 30 8. Papavizas, G.C., *Strain of Trichoderma viride to control fusarium wilt*. 1984, Los Estados Unidos de América representados por el Departamento de Agricultura, Washington, D.C.: Estados Unidos. págs. 1-4.
- 35 9. Chet, I. y A. Silvan, *Novel isolates of Trichoderma, fungicidal compositions containing said isolates and use thereof* 1988, Compañía de Investigación y Desarrollo de Yissura de la Universidad Hebrea de Jerusalén, Jerusalén, Israel: Estados Unidos. págs. 1-44.
- 40 10. Smith, V.L., W.F. Wilcox, y G.E. Harman, *Biological control of phytophthora by Trichoderma* 1991, Cornell Research Foundation, Inc.: Estados Unidos. págs. 1-4.
- 45 11. Elad, Y., et al., *Isolate of Trichoderma fungicidal compositions containing said isolate and use against B. Cinerea and S. Sclerotium*. 1993, Peri Applications (1885) Ltd., Bet Dagan; Compañía de Investigación y Desarrollo de Yissura de la Universidad Hebrea de Jerusalén, Jerusalén, ambos de Israel: Estados Unidos. págs. 1-7.
12. McBeath, J.H., *Cold tolerant Trichoderma* 1995, La Universidad de Alaska-Fairbanks, Fairbanks, Ak.: Estados Unidos. págs. 1-29.
- 50 13. Hermosa, M., et al., *Composition comprising fungi of genus Trichoderma used as biological control agent and the applications thereof* 2005, Newbiotechnic, S.A., Sevilla (ES), Universidad de Salamanca, Salamanca (ES): Estados Unidos. págs. 1-9.
14. Herrera, A., R. Galdames, y J. Martinez, *Trichoderma spp strains with high capacity of fungus biological control and selection process thereof by molecular markers* 2010, Cosmocel, S.A, San Nicolas de los Garza, Nuevo León (MX): Estados Unidos. págs. 1-11.
- 55 15. Pertot, t., et al., *Trichoderma atroviridae SC1 for biocontrol of fungal diseases in plants* 2013, Tretino Sviluppo S.p.A., Rovereto (IT); Fundación Edmund Mach, San Michele All'Adige (IT): Estados Unidos. págs. 1-26.
- 60 16. Harman, G.E., *Trichoderma strains that induce resistance to plant diseases and/or increase plant growth* 2014, Universidad Cornell, Ithaca, NY (US): Estados Unidos. págs. 1-20.
17. Zhao, Y., Tu, K., Shao, X., Jing, W., Su, Z., *Effects of the yeast Pichia guilliermondii against Rhizopus nigricans on tomato fruit*. 2008, Postharvest Biology and Technology. págs. 113-120.
- 65 18. Zhang, D., Spadaro, D., y A. Garibaldi, Gullino M.L., *Potential biocontrol activity of a strain of Pichia guilliermondii*

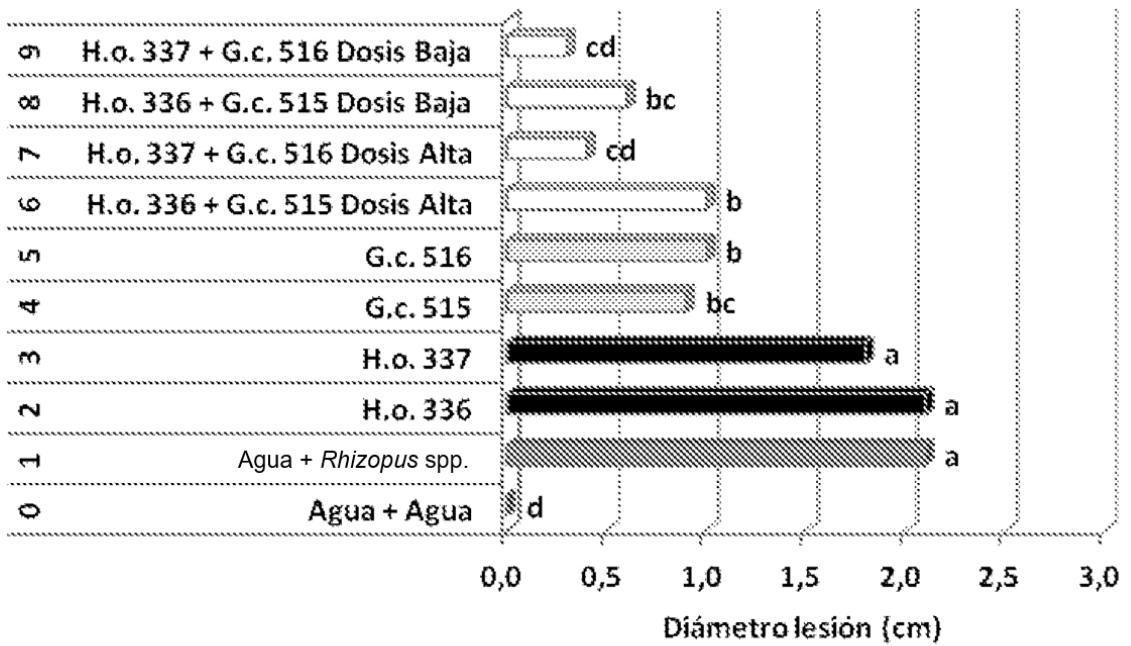
- against grey mold of apples and its possible modes of action. 2011, Biological Control. págs. 193-201.
19. Lahlali, R., *et al.*, *Control of citrus blue mold by the antagonist yeast Pichia guilliermondii Z1: Compatibility with commercial fruit waxes and putative mechanisms of action.* Food Control, 2014. 45: págs. 8-15.
20. Li, C., *et al.*, *Ascorbic acid enhances oxidative stress tolerance and biological control efficacy of Pichia caribbica against postharvest blue mold decay of apples.* Journal of agricultural and Food Chemistry, 2014. 62: págs. 7612-7621.
21. Filonow, A.B., *Yeast reduce the stimulatory effect of acetate esters from apple on the germination of Botrytis cinerea Conidia.* 1999: Journal of Chemical Ecology.
22. Filonow, A.B., *Butyl acetate and yeast interact in adhesion and germination of Botrytis cinerea conidia in vitro and in fungal decay of Golden Delicious apple.* 2001: Journal of Chemical Ecology.
23. Pujos, P., D. Colavizza, y P. Vandekerckove, *Saccharomyces cerevisiae strains with phytosanitary capabilities* 2013, Lesaffre et Compagnie, París (FR): Estados Unidos. págs. 1-9.
24. Shanmuganathan, N., *Yeasts as a biocontrol for microbial diseases of fruit* 1996, Daratech Proprietary Limited, Victoria, Australia: Estados Unidos. págs. 1-11.
25. Calvo-Garrido, C., *et al.*, *Candida sake CPA-1 and other biologically based products as potential control strategies to reduce sour rot of grapes.* 2013. págs. 356-361.
26. El Ghaouth, A. y C. Wilson, *Candida Saitoana compositions for biocontrol of plant postharvest decay.* 2002, Biotechnology Research and Development Corporation, Peoria, IL (US); Los Estados Unidos de América representados por el Departamento de Agricultura, Washington, DC (EE. UU.): Estados Unidos. págs. 1-5.
27. Nally, M.C., *et al.*, *Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by Saccharomyces and other yeast species.* Postharvest Biology and Technology, 2013. 86: págs. 456-462.
28. Nally, M.C., *et al.*, *Biocontrol of Botrytis cinerea in table grapes by non-pathogenic indigenous Saccharomyces cereviceae yeast isolated from viticultural environments in Argentina.* Postharvest Biology and Technology, 2012. 64: págs. 40-48.
29. Mercado, Y., *et al.*, *Application of Bacillus subtilis in the biological control of the phytopathogenic fungus Sporisorium reilianum.* Biological Control, 2014. 76: págs. 36-40.
30. Takayanagi, T., S. Suzuki, and S. Furuya, *Bacillus subtilis KS1 as a plant disease control agent* 2013, University of Yamanashi, Yamanashi (JP): Estados Unidos. págs. 1-8.
31. Martinez, A.I.F., *et al.*, *Pure culture of strain AH2 of the Bacillus velezensis species and a product for the biological control of phytopathogenic fungi.* 2013, Probelte, S.A., Espinardo (ES): Estados Unidos. págs. 1-8.
32. Jacobsen., B., N.K. Zidack., y R. Larson., *Bacillus isolates and methods of their use to protect against plant pathogens* 2012, Montana State University, Bozeman, MT (US): Estados Unidos. págs. 1-30.
33. Bergstrom, G.C. y W.C.d. Luz, *Biocontrol Subtilis, Pseudomonas putida and Sporobolomyces roseus.* 2005, Cornell Research Foundation, Inc. Ithaca, NY (US); Embrapa Trigo (BR): Estados Unidos. págs. 1-17.
34. Drahos, D., J. y L. West, *Bacillus Licheniformis biofungicide* 2004, Novozymes Biologicals, Inc.: Estados Unidos. págs. 1-9.
35. Lehman, L.J., *et al.*, *Strain of Bacillus for controlling plant diseases* 2003, AgraQuest, Inc, Davis, CA (US): Estados Unidos. págs. 1-20.
36. Lehman, L.J., *et al.*, *Strain of Bacillus pumilus for controlling plant diseases caused by fungi* 2001, AgraQuest, Inc, Davis, CA (US): Estados Unidos. págs. 1-9.
37. Marrone, P.G., *et al.*, *Biological control of plant fungal infections.* 1999, Agritope, Inc., Portland, Oreg: Estados Unidos. págs. 1-19.
38. Neyra, C.A. y L. Sadasivan, *Bacillus licheniformis producing antifungal agents and uses thereof for control of phytopathogenic fungi* 1997, Rutgers, La Universidad Estatal de New Jersey, Piscataway, N.Y.: Estados Unidos. págs. 1-16.
39. Pusey, P.L. y C.L. Wilson, *Postharvest biological control of stone fruit brown rot by Bacillus subtilis* 1988, Los

- Estados Unidos de América representados por el Departamento de Agricultura, Washington, D.C.: Estados Unidos. págs. 1-8.
- 5 40. Kyung, M. y K. Deok, *Biocontrol activity and root colonization by Pseudomonas corrugate strains CCR04 and CCR80 against Phytophthora blight of pepper*. 2014, Biocontrol. págs. 437-448.
41. Spago, F., *et al.*, *Pseudomonas aeruginosa produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic Xanthomonas species*. Vol. 62. 2014, Crop Protection. 46-54.
- 10 42. Leifer, C., H.A.C. Epton, y D.C. Sigee, *Biological control of fungal postharvest diseases with bacteria* 1999, El Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de Su Majestad Británica del Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Reino Unido: Estados Unidos. págs. 1-36.
- 15 43. Castillo, N.A., *Biofungicidal composition for controlling phytopathogenic fungi*. 2013, Universidad de Santiago de Chile: Estados Unidos. págs. 1-15.
44. Sengun, I. y S. Karabiyikli, *Review, Importance of acetic acid bacteria in food industry*. 2011. págs. 647-656.
- 20 45. Bevardi, M., *et al.*, *Antifungal and antipatulín activity of Gluconobacter oxydans isolated from Apple surface*. 2013: Arth Hig Rada Toksikol, . págs. 279-284.
46. Hommel, R.K., *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2 ed. Vol. 1. 2014.
- 25 47. Kommanee, J., *et al.*, *Indetification of Gluconobacter strains isolated in Thailand base on 16S-23S rRNA gene ITS restriction and 16S rRNA gene sequence analyses*. Annals of Microbiology, 2008. **58**(4): págs. 741-747.
48. Mateo, E., *et al.*, *Acetic acid bacteria isolated from grapes of South Australian vineyards*. International Journal of Food Microbiology, 2014. 178: págs. 98-106.
- 30 49. Barbe, J., *et al.*, *Role of Botrytized grape micro-organisms in SO₂ binding phenomena.*, D. Revel, Editor. 2001: Journal of Applied Microbiology.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un producto biológico para el control de enfermedades fúngicas en plantas, caracterizado porque comprende una combinación de bacterias de *Gluconobacter cerinus* 515 con código de acceso RGM2215, depositada en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos a una concentración entre 1×10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/ml] y 1×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/ml] y *Hanseniaspora osmophila* 337 con código de acceso RGM2214, depositada en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos a una concentración entre 1×10^4 unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/ml] y 1×10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/ml].
- 10 2. Un producto biológico según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha combinación comprende bacterias de *Gluconobacter cerinus* 515 a una concentración de 1×10^6 [UFC/ml] y levadura de *Hanseniaspora osmophila* 337 a una concentración de 1×10^4 [UFC/ml].
- 15 3. Uso de un producto biológico según las reivindicaciones 1 o 2, para el tratamiento, prevención, control o cura de enfermedades fúngicas en plantas.
- 20 4. Uso de un producto biológico según la reivindicación 3, caracterizado porque la enfermedad fúngica que puede tratarse, prevenirse, controlarse y curarse es pudrición ácida o pudrición de la vid.
- 25 5. Uso de un producto biológico según la reivindicación 3, caracterizado porque la enfermedad fúngica que puede tratarse, prevenirse, controlarse o curarse es pudrición gris.
- 30 6. Uso de un producto biológico según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado porque las enfermedades fúngicas se producen por *Aspergillus* spp.
- 35 7. Uso de un producto biológico según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado porque las enfermedades fúngicas se producen por *Penicillium* spp.
8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado porque las enfermedades fúngicas se producen por *Botrytis* spp.
9. Uso de un producto biológico según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado porque las enfermedades fúngicas se producen por *Zygomycota*.
10. Uso de un producto biológico según la reivindicación 9, caracterizado porque *Zygomycota* es *Rhizopus* spp.

A) Efecto contra *Rhizopus* spp. (4 días post infección)



B) Efecto contra *Rhizopus* spp. (15 días post infección)

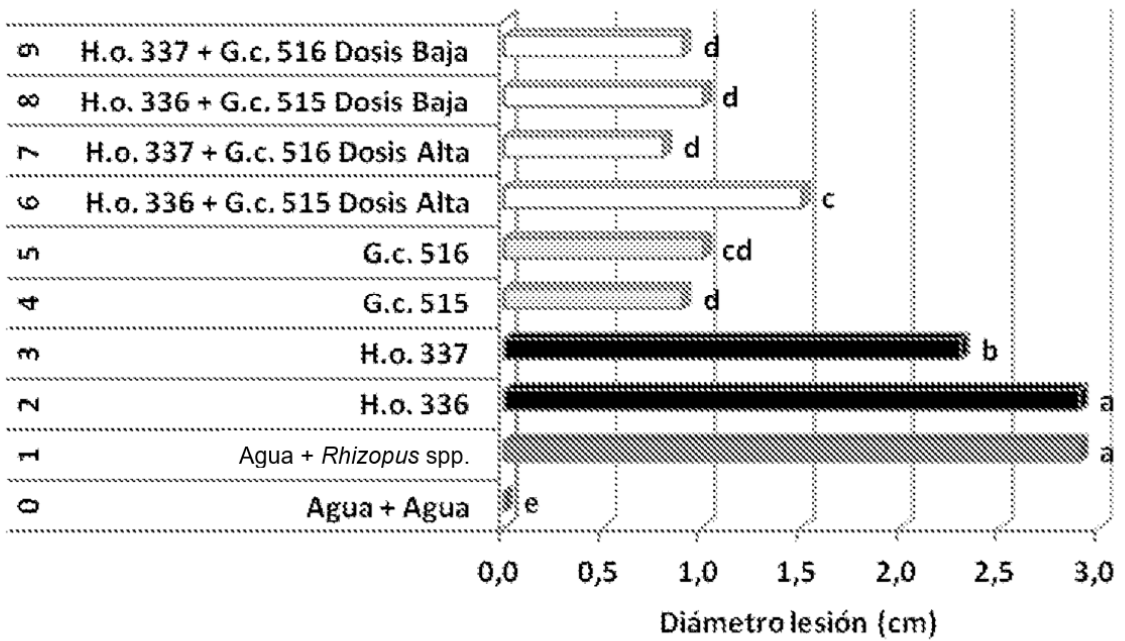
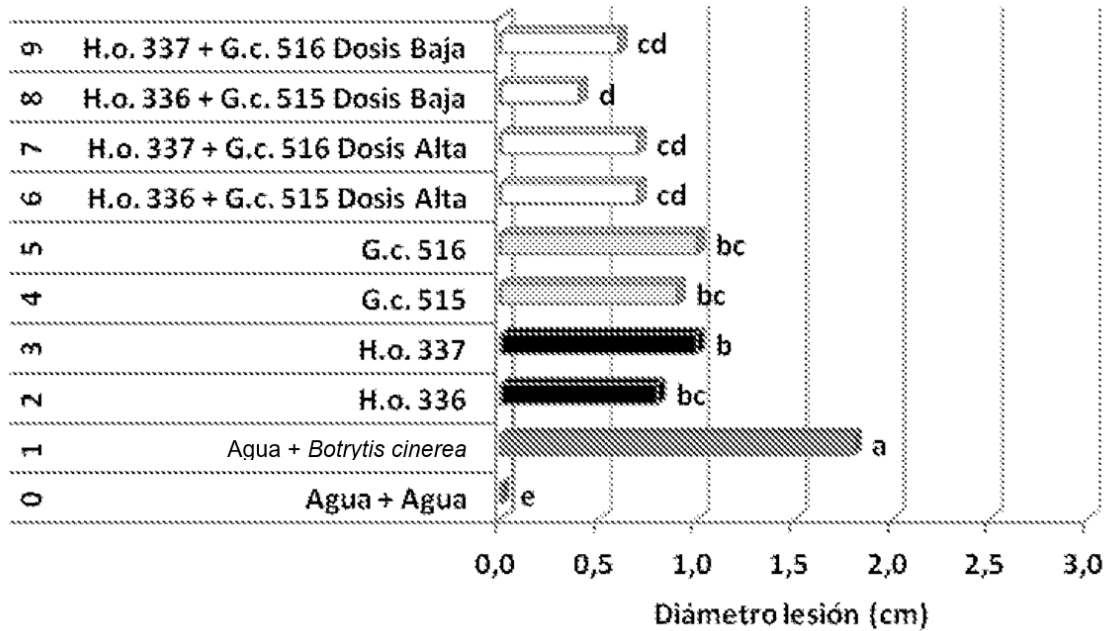


FIG. 1

A) Efecto contra *Botrytis cinerea* (4 días post infección)



B) Efecto contra *Botrytis cinerea* (15 días post infección)

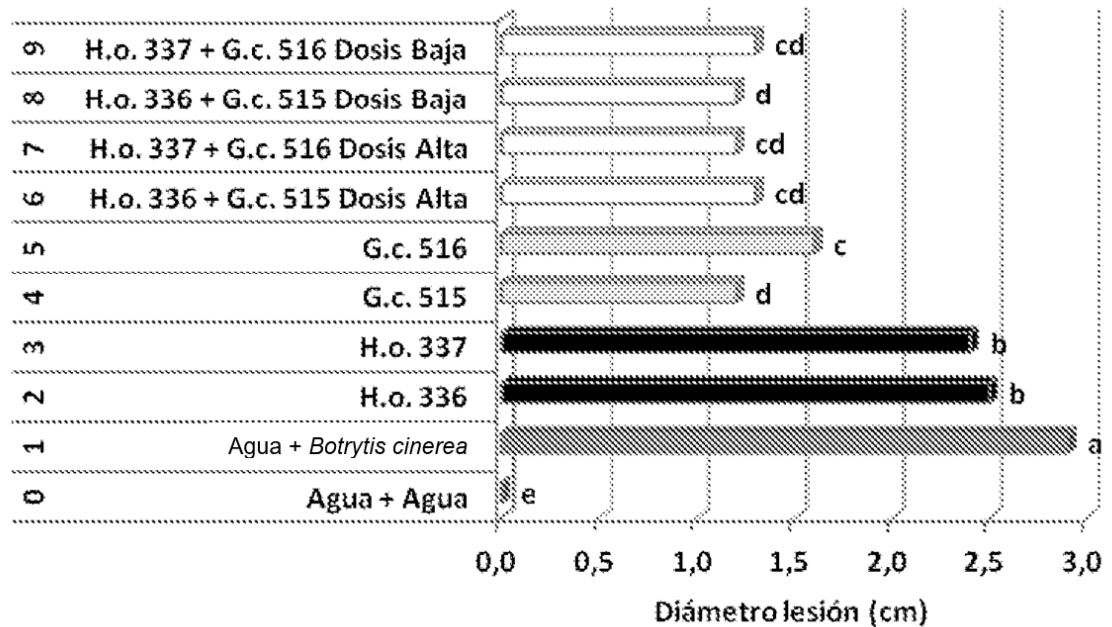
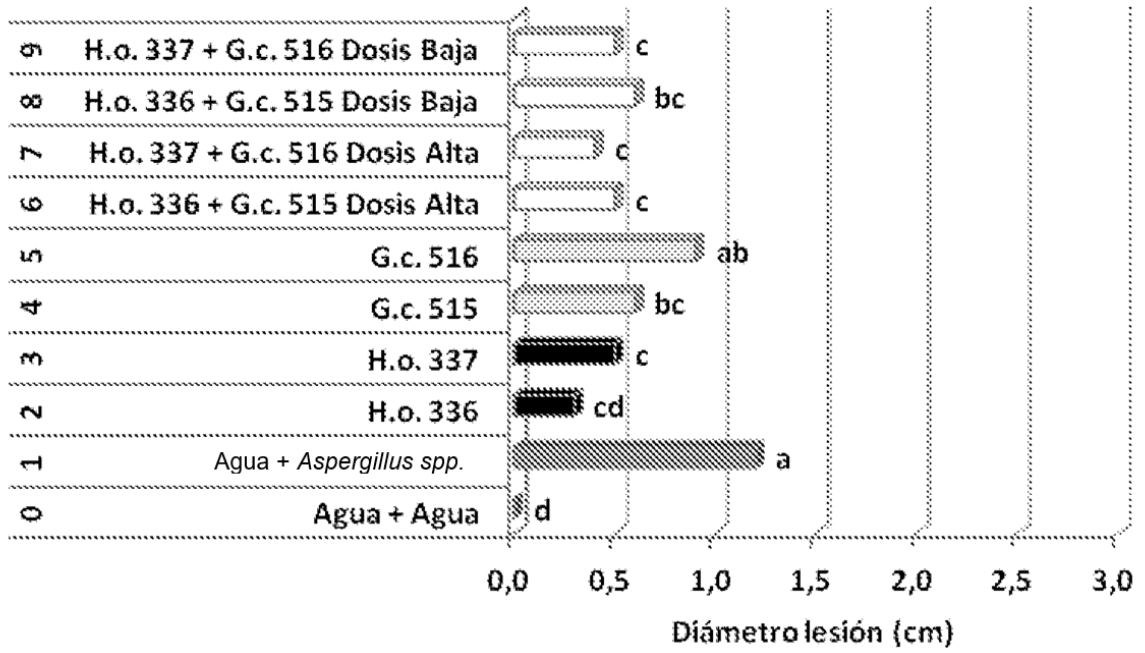


FIG. 2

A) Efecto contra *Aspergillus* spp. (4 días post infección)



B) Efecto contra *Aspergillus* spp. (15 días post infección)

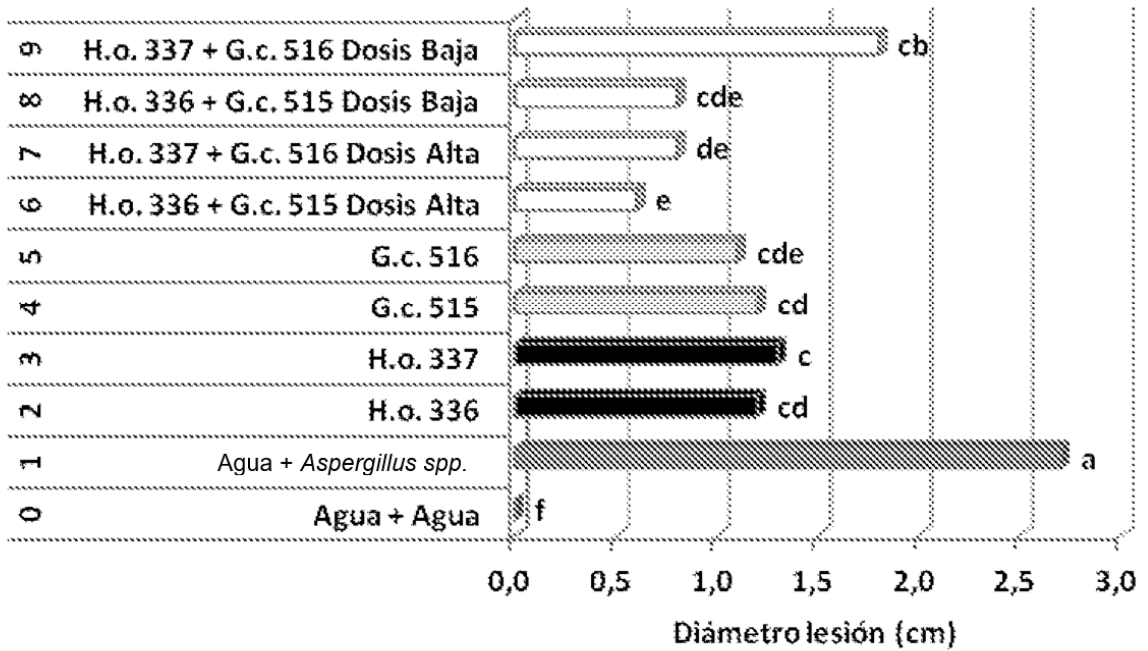
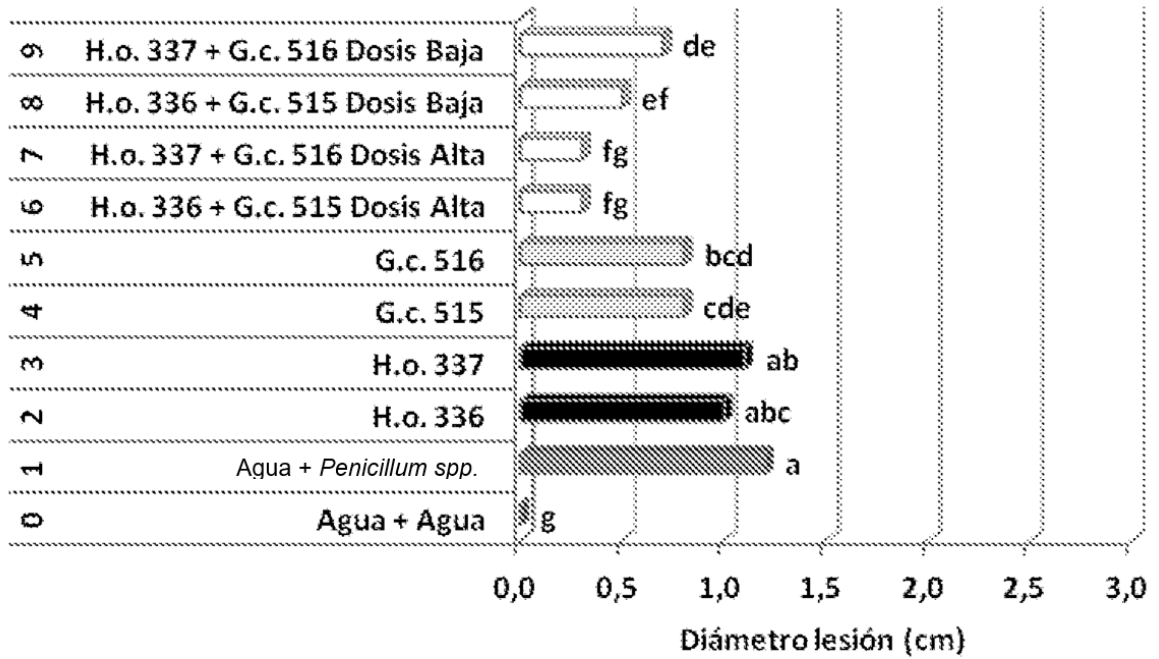


FIG. 3

A) Efecto contra *Penicillium* spp. (4 días post infección)



B) Efecto contra *Penicillium* spp. (15 días post infección)

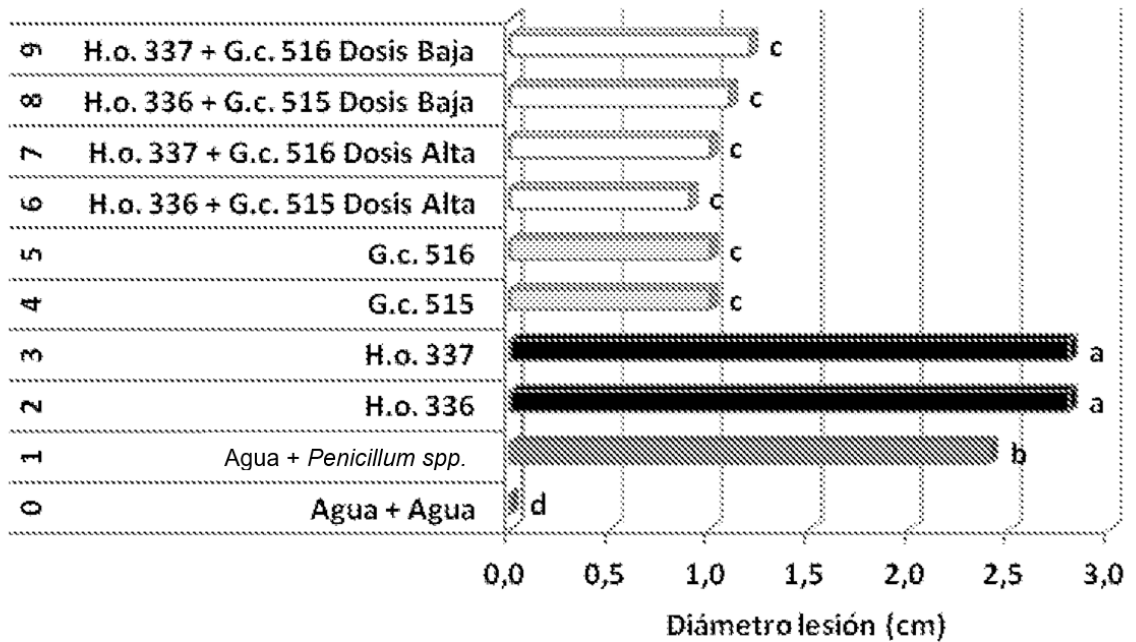
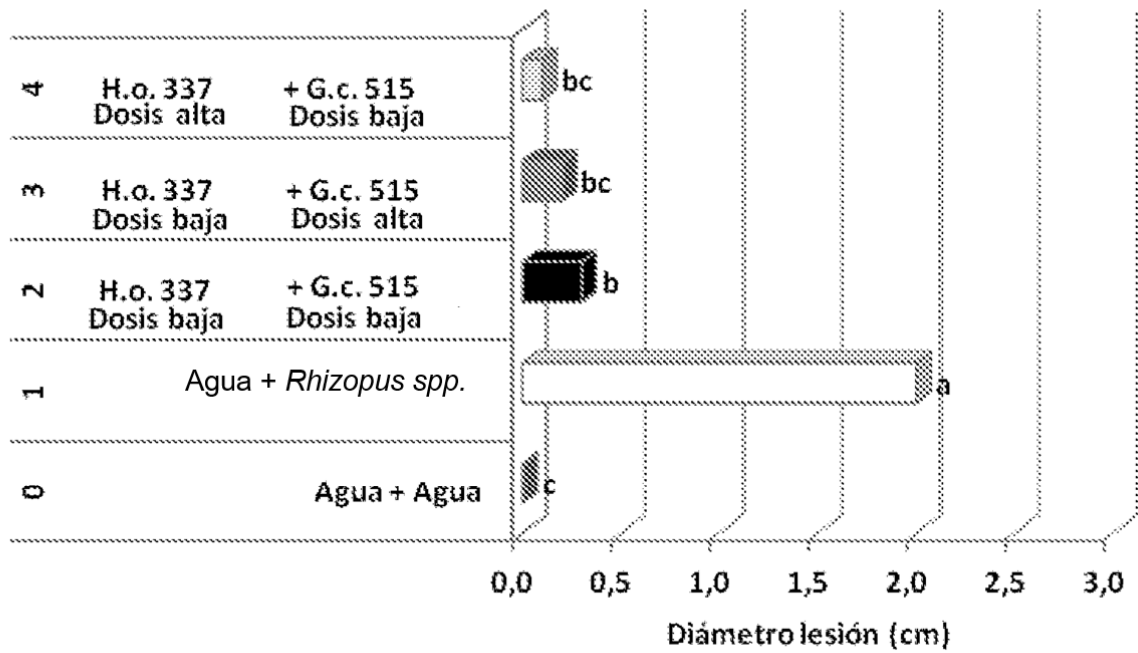


FIG. 4

A) Efecto contra *Rhizopus* spp. (4 días post infección)



B) Efecto contra *Rhizopus* spp. (20 días post infección)

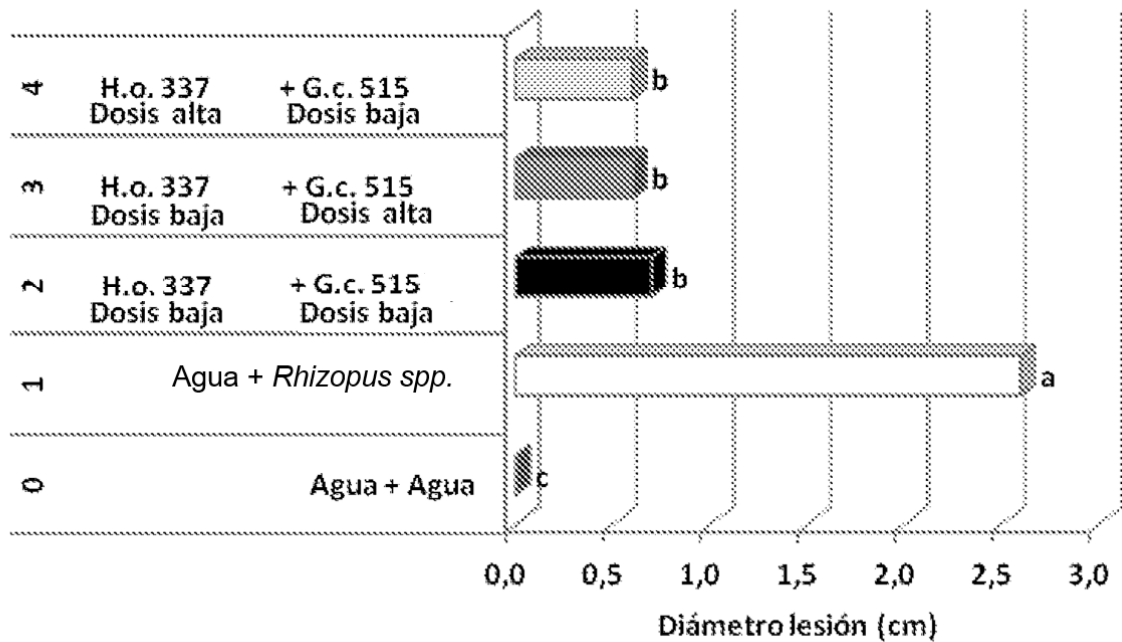
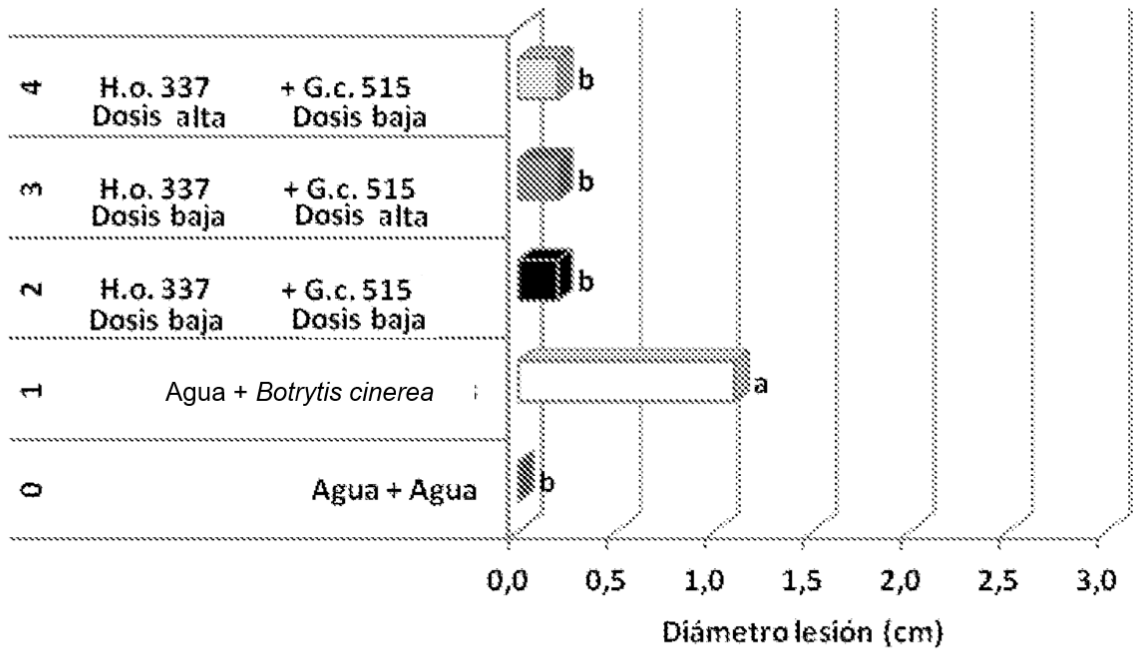


FIG. 5

A) Efecto contra *Botrytis cinerea* (4 días post infección)



B) Efecto contra *Botrytis cinerea* (20 días post infección)

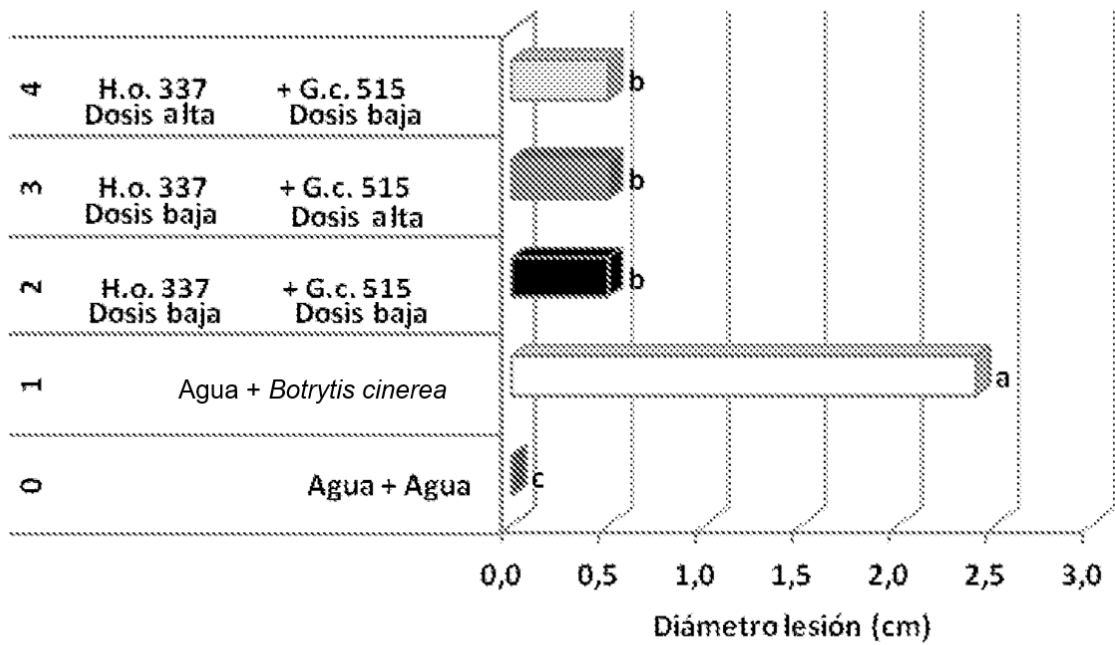
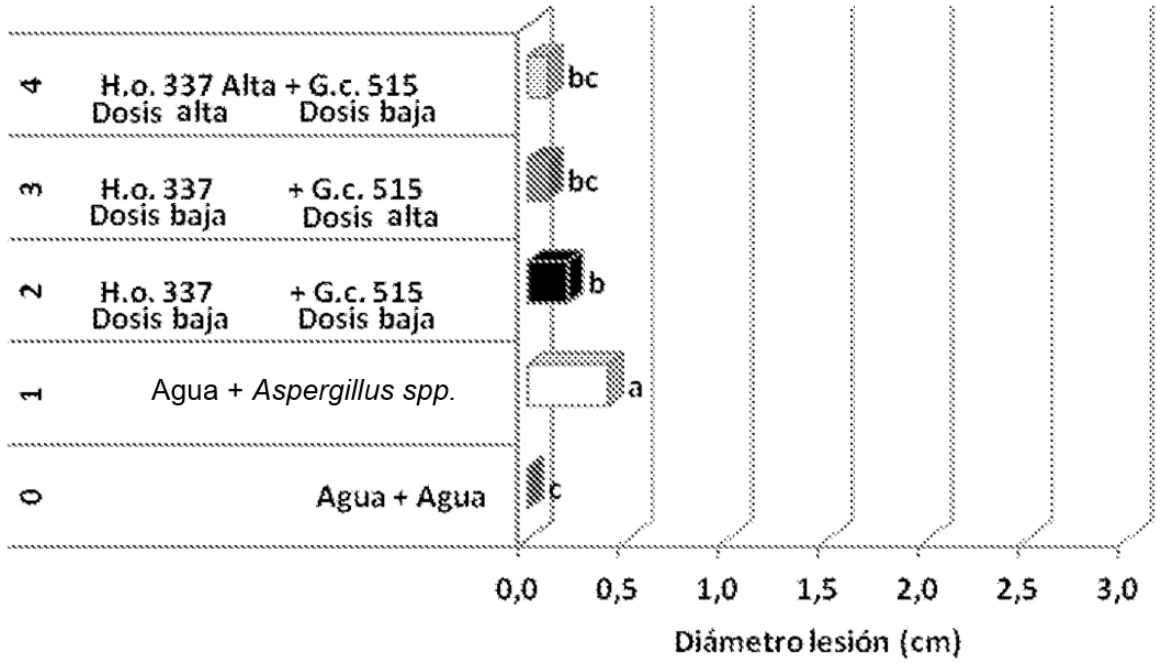


FIG. 6

A) Efecto contra *Aspergillus* spp. (4 días post infección)



B) Efecto contra *Aspergillus* spp. (20 días post infección)

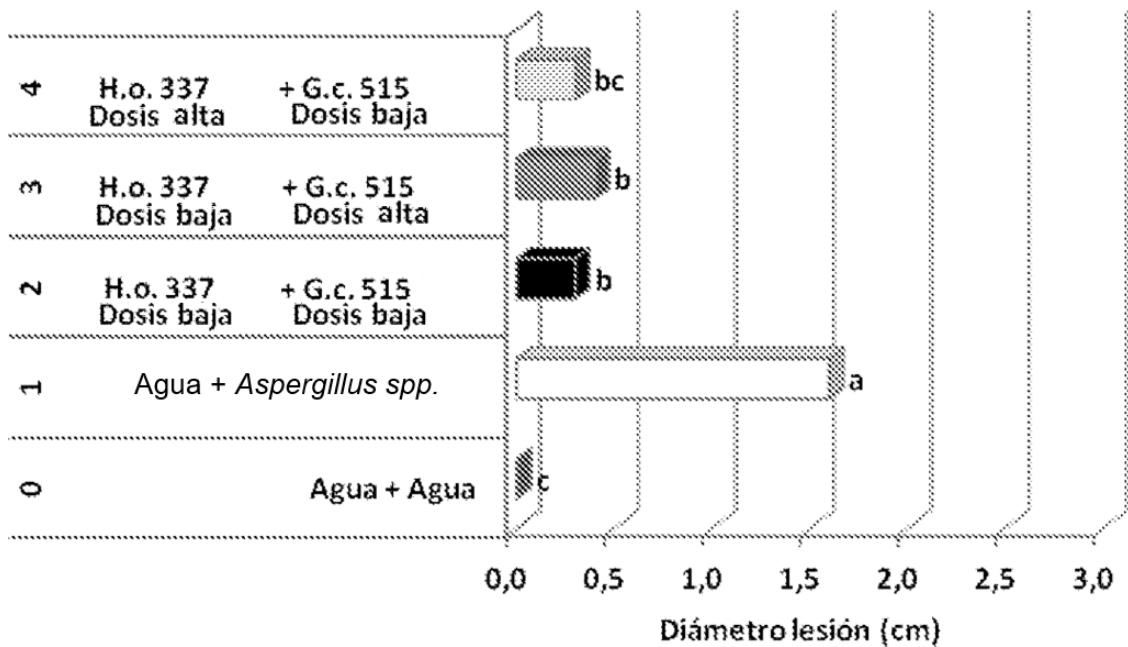
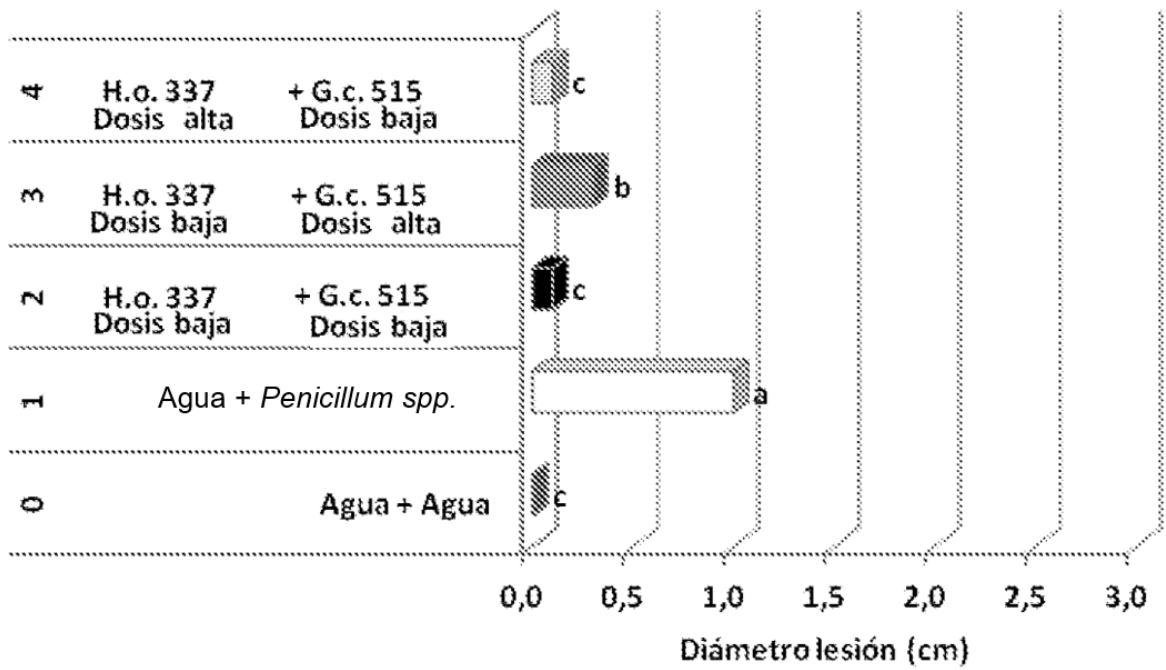


FIG. 7

A) Efecto contra *Penicillium* spp. (4 días post infección)



B) Efecto contra *Penicillium* spp. (20 días post infección)

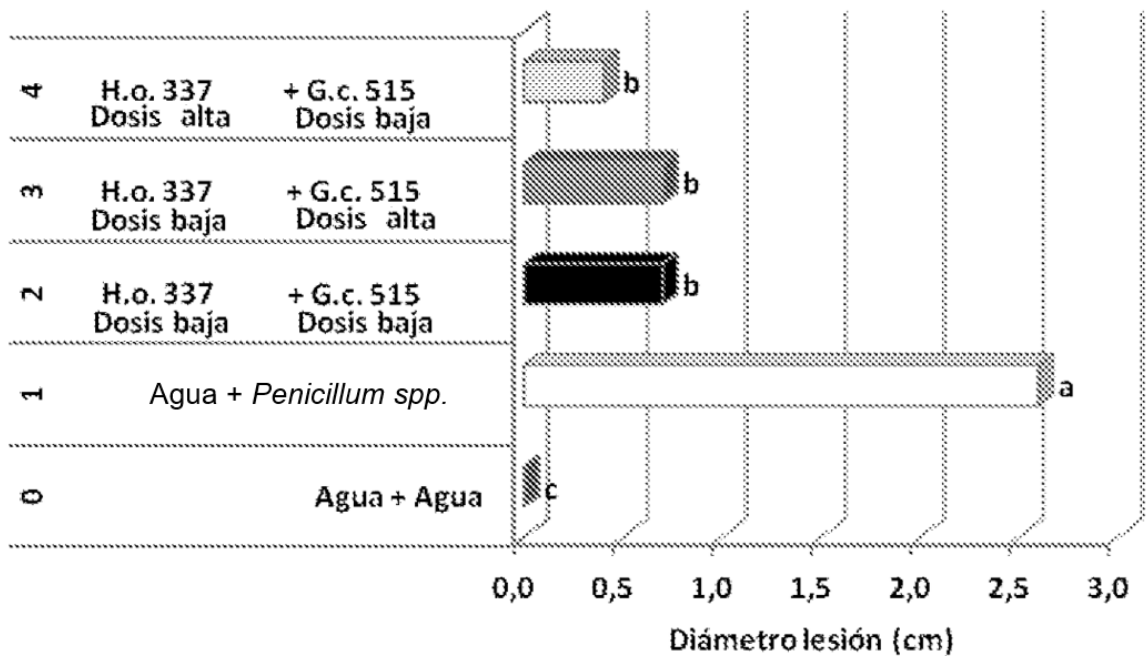
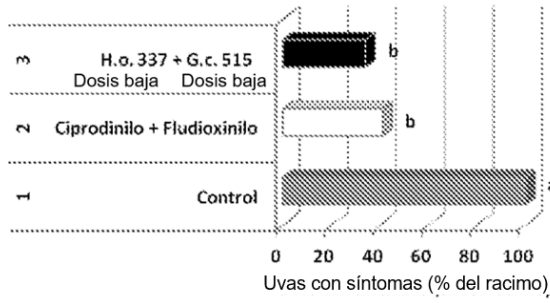
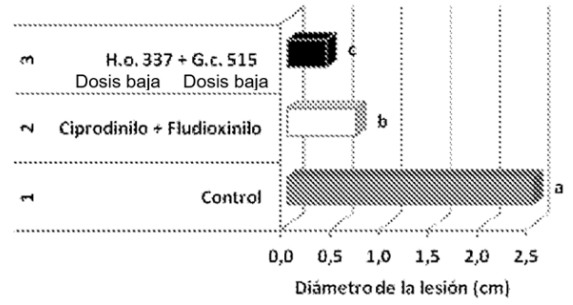


FIG. 8

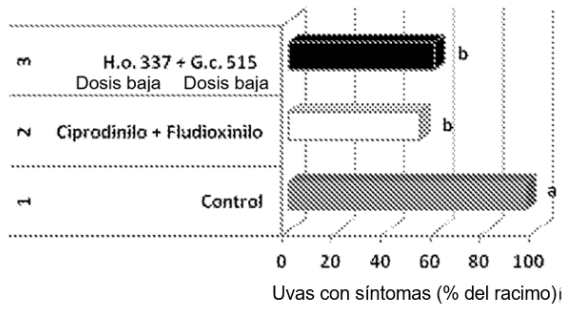
A) Pudrición del racimo (con herida): Incidencia



B) Pudrición del racimo (con herida): Severidad



C) Pudrición del racimo (sin herida): Incidencia



D) Pudrición del racimo (sin herida): Severidad

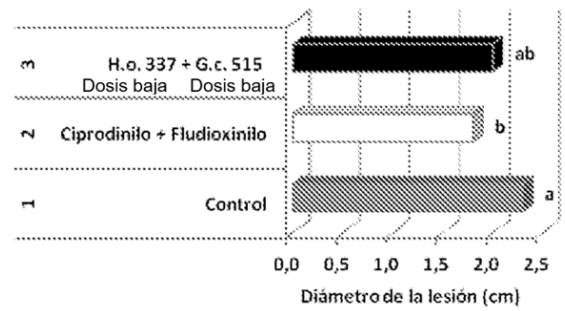


FIG. 9

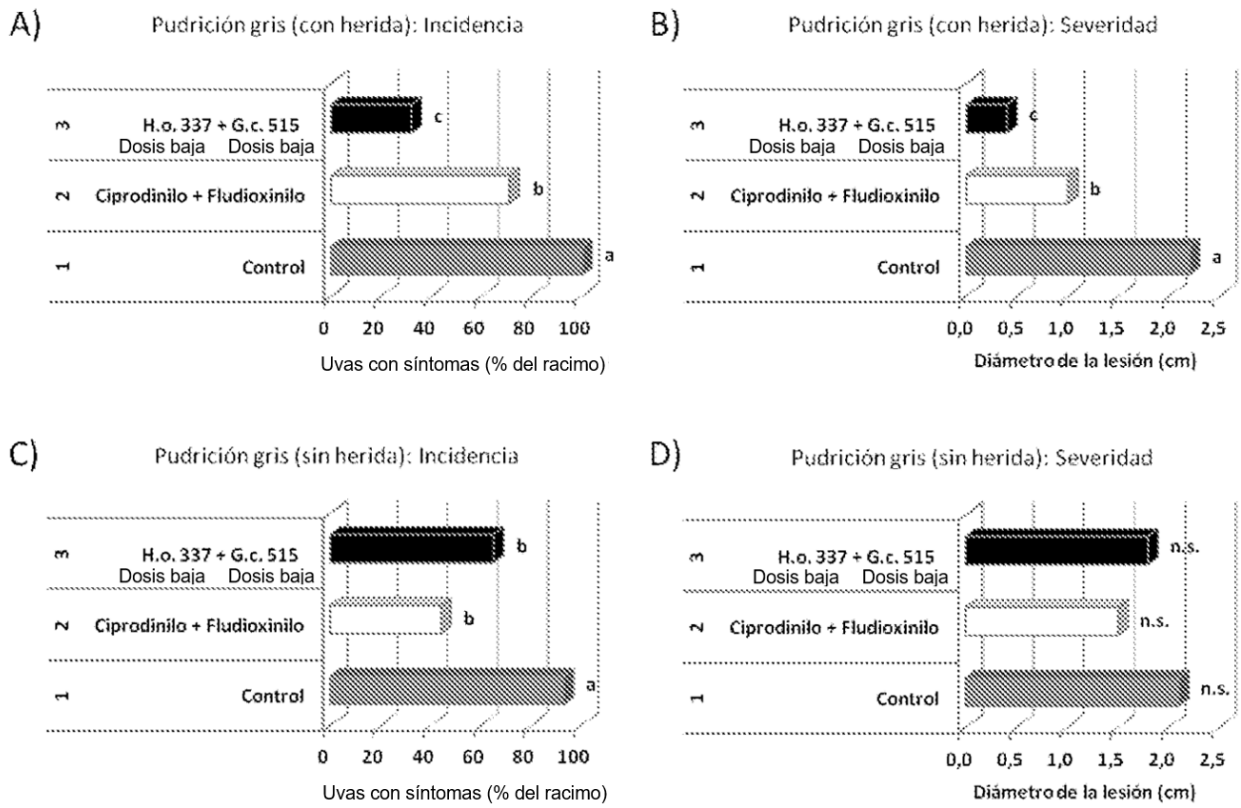
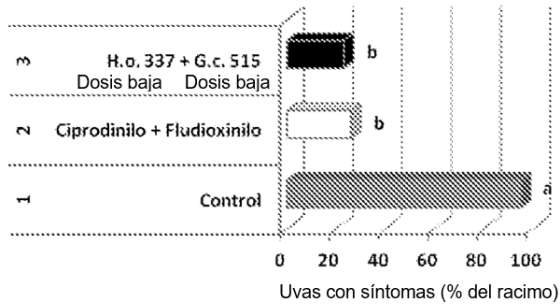
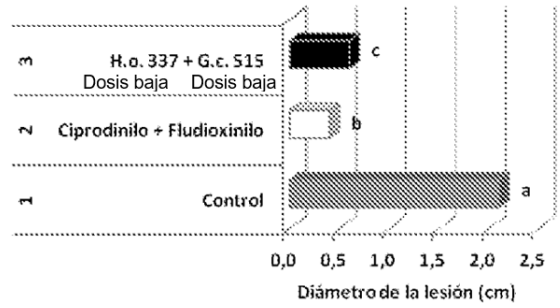


FIG. 10

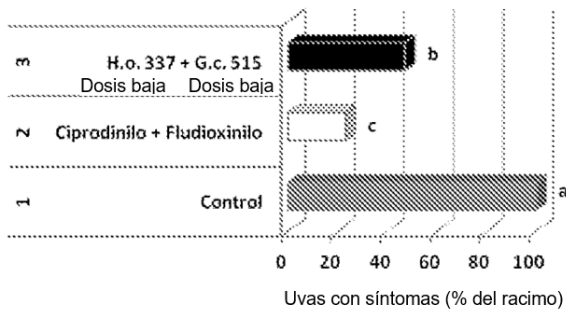
A) Pudrición del racimo (con herida): Incidencia



B) Pudrición del racimo (con herida): Severidad



C) Pudrición del racimo (sin herida): Incidencia



D) Pudrición del racimo (sin herida): Severidad

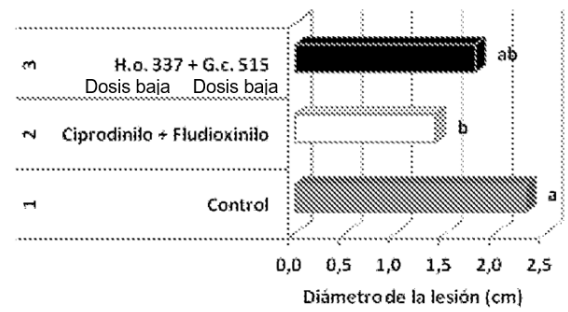


FIG. 11

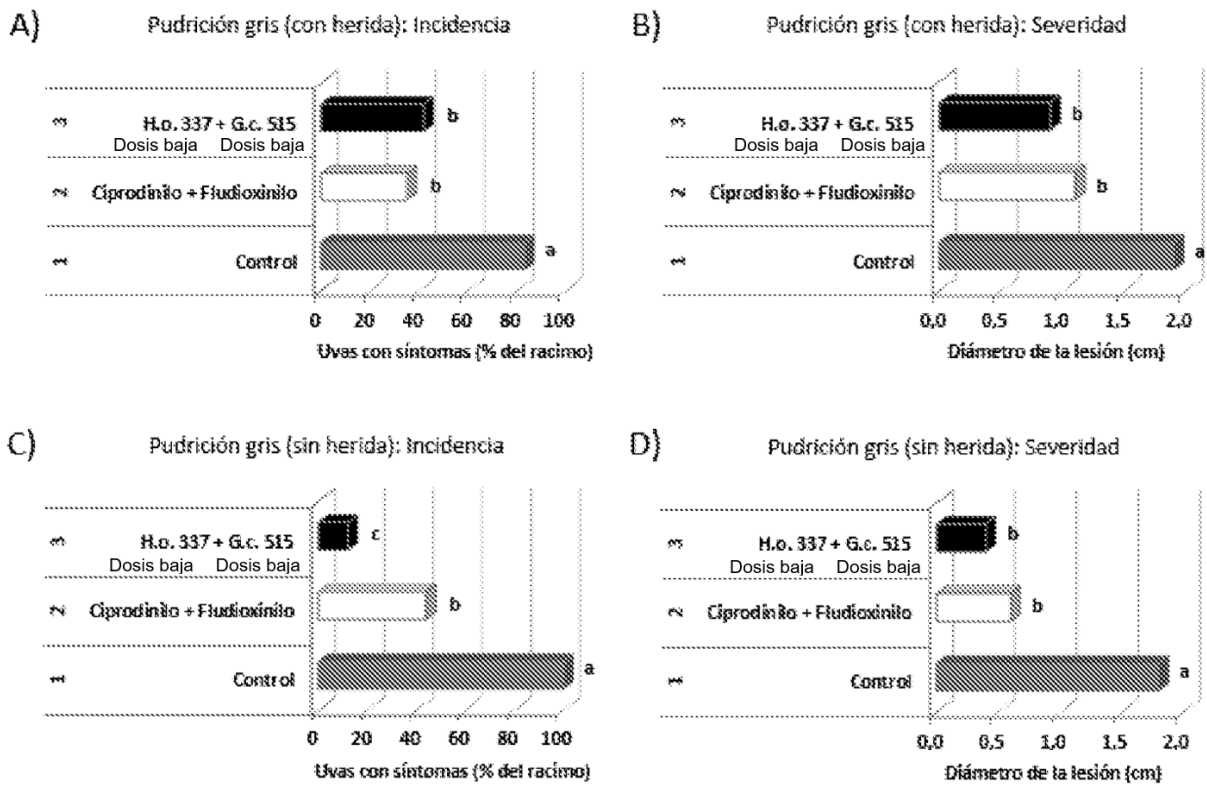


FIG. 12