


PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
 Oficina Internacional
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
 EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**

<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes⁶ : C12N 1/16, A01N 63/04, A23B 7/155 // (C12N 1/16, C12R 1:72)</p>	A1	<p>(11) Número de publicación internacional: WO 96/30495</p> <p>(43) Fecha de publicación internacional: 3 de Octubre de 1996 (03.10.96)</p>
<p>(21) Solicitud internacional: PCT/ES96/00064</p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: 25 de Marzo de 1996 (25.03.96)</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad: P 9500602 28 de Marzo de 1995 ES (28.03.95)</p> <p>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): SIPCAM INAGRA, S.A. [ES/ES]; Calle Profesor Beltrán Báguena, 5, E-46009 Valencia (ES).</p> <p>(72) Inventores; e</p> <p>(75) Inventores/solicitantes (sólo US): VIÑAS ALMENAR, Inmaculada [ES/ES]; Calle Alcalde Pujol, 9, E-25006 Lleida (ES). USALL I RODIE, Josep [ES/ES]; Calle Moll, 6, E-25125 Alguaire (ES). TEIXIDO I ESPASA, Neus [ES/ES]; Calle Angel, 8, E-25183 Seros (ES). SANCHIS ALMENAR, Vicente [ES/ES]; Calle Alcalde Pujol, 9, E-25006 Lleida (ES).</p> <p>(74) Mandatario: FERREGÜELA COLON, Eduardo; Calle Provenza, 304, E-08008 Barcelona (ES).</p>		<p>(81) Estados designados: AL, AM, AT, AT (Modelo de utilidad), AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, CZ (Modelo de utilidad), DE, DE (Modelo de utilidad), DK, DK (Modelo de utilidad), EE, EE (Modelo de utilidad), FI, FI (Modelo de utilidad), GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (Modelo de utilidad), TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, Patente ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publicada Con informe de búsqueda internacional.</p>
<p>(54) Title: NOVEL STRAIN OF THE YEAST CANDIDA SAKE (SAITO AND OTA) VAN UDEN AND BUCKLEY AND ITS USE AS BIOLOGICAL CONTROL AGENT IN FUNGAL DISEASES OF POSTHARVESTED FRUITS</p> <p>(54) Título: NUEVA CEPA DE LA LEVADURA CANDIDA SAKE (SAITO AND OTA) VAN UDEN AND BUCKLEY Y SU UTILIZACIÓN COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES FÚNGICAS DE POSTCOSECHA EN FRUTAS</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>There is disclosed a novel strain of the yeast <i>Candida sake</i> (Saito and Ota) van Uden and Buckley and its use as biological control agents for fungal diseases of postharvested fruits. Said strain, deposited with the number CECT-10817, is used as antagonist of fungi responsible for the fruit rot after it has been harvested and during the storage period. The effectiveness of said antagonist is very high and is comparable to that of antifungal chemical products widely used. Said activity is intensively elicited particularly in low temperature storage conditions and in low oxygen environments. The antagonist is efficient to combat rot caused by, among other micro-organisms, the fungi of the species <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Penicillium expansum</i> and <i>Rhizopus nigricans</i>.</p>		
<p>(57) Resumen</p> <p>Se describe una nueva cepa de la levadura <i>Candida sake</i> (Saito and Ota) van Uden and Buckley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de postcosecha en frutas. Dicha cepa, depositada con el número CECT-10817, se utiliza como antagonista de los hongos responsables de la podredumbre de la fruta después de su recolección y durante el período de almacenamiento. La efectividad de dicho antagonista resulta ser muy elevada y es comparable a la de los productos químicos antifúngicos más utilizados. Dicha actividad se manifiesta con especial intensidad cuando se producen condiciones de almacenamiento a bajas temperaturas y en ambientes pobres en oxígeno. El antagonista resulta efectivo para combatir la podredumbre causada por, entre otros microorganismos, los hongos de las especies <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Penicillium expansum</i> y <i>Rhizopus nigricans</i>.</p>		

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AM	Armenia	GB	Reino Unido	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	México
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Grecia	NL	Países Bajos
BE	Bélgica	HU	Hungria	NO	Noruega
BF	Burkina Faso	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelandia
BG	Bulgaria	IT	Italia	PL	Polonia
BJ	Benin	JP	Japón	PT	Portugal
BR	Brasil	KE	Kenya	RO	Rumania
BY	Belarús	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CA	Canadá	KP	República Popular Democrática de Corea	SD	Sudán
CF	República Centroafricana	KR	República de Corea	SE	Suecia
CG	Congo	KZ	Kazajstán	SG	Singapur
CH	Suiza	LI	Liechtenstein	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Eslovaquia
CM	Camerún	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lituania	SZ	Swazilandia
CS	Checoslovaquia	LU	Luxemburgo	TD	Chad
CZ	República Checa	LV	Letonia	TG	Togo
DE	Alemania	MC	Mónaco	TJ	Tayikistán
DK	Dinamarca	MD	República de Moldova	TT	Trinidad y Tabago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ucrania
ES	España	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finlandia	MN	Mongolia	US	Estados Unidos de América
FR	Francia	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistán
GA	Gabón			VN	Viet Nam

Nueva cepa de la levadura *Candida sake* (Saito and Ota) van Uden and Buckley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de postcosecha en frutas.

5

Campo de la técnica

La presente invención se refiere a una nueva cepa de la levadura *Candida sake* y a su utilización como antagonista para el control biológico de las infecciones fúngicas de la fruta recolectada, con el objeto de prevenir la podredumbre de la fruta en condiciones de almacenamiento.

15 **Estado de la técnica**

Las enfermedades de postcosecha de las frutas producen pérdidas anuales en la agricultura que se estiman, a nivel mundial, en una cantidad del orden de un 15% a un 20% del total de las cosechas.

En la actualidad, el sistema más utilizado para combatir a los hongos causantes de la podredumbre de las frutas después de su recolección es el control químico, mediante tratamiento de las cosechas con productos fungicidas. El empleo de los fungicidas está bastante extendido a nivel mundial y se estima que supone hasta el 26% de los pesticidas de los mercados europeo y asiático y , en el caso del mercado norteamericano, hasta el 6%.

La utilización masiva de dichos productos fungicidas ha generado una serie de problemas, tales como la aparición de cepas patogénicas resistentes - lo que repercute en el incremento progresivo de los costes de los tratamientos y en el aumento de los niveles de pérdidas por podredumbre - y el incremento de residuos de fungicidas en los frutos que provoca problemas de tipo sanitario y dificulta las exportaciones a los países que

poseen una reglamentación sanitaria restrictiva sobre el tema.

Ante dicho problema se ha comenzado a desarrollar, hace relativamente pocos años, una actividad investigadora con el fin de encontrar nuevos métodos alternativos para el control de las enfermedades de los frutos en su etapa de postcosecha, siendo una de las vías de desarrollo más destacadas el control biológico de los hongos causantes de la podredumbre. Dicho control biológico se fundamenta en la acción inhibidora de algunos microorganismos sobre el crecimiento y acción de los hongos patógenos. Así, Janisiewicz, W.J., *Phytopathology* 77:481-485 (1987), ha descrito un tratamiento de control biológico del moho azul de las manzanas; Janisiewicz, W.J. and Roitman, J., *Phytopathology* 77:1776 (1987), describen la utilización de *Pseudomonas cepacia* como agente de biocontrol postcosecha para combatir la podredumbre de las manzanas; Janisiewicz, W.J. and Roitman, J., *Phytopathology* 78:1697-1700 (1988), describen la utilización de *Pseudomonas cepacia* como agente de biocontrol postcosecha para combatir los mohos gris y azul de las manzanas y las peras.

Entre los antagonistas de los hongos causantes de la podredumbre de la fruta, resultan de particular interés las levaduras, que pueden colonizar la superficie del fruto durante largos períodos de tiempo, produciendo polisacáridos extracelulares que potencian su supervivencia y que limitan los lugares de colonización y la germinación de los propágulos fúngicos, debido a que utilizan más rápidamente los nutrientes disponibles. Así, McLaughlin, R.J. et al., *Phytopathology* 80:456-461 (1990), describen los efectos de la concentración de las levaduras *Candida sp.* en el control biológico de las enfermedades de postcosecha de la manzana; la solicitud de patente PCT WO-91/1641 describe la utilización, como agentes para el control biológico de enfermedades de postcosecha de

productos vegetales, de varias levaduras, entre ellas cepas o aislados pertenecientes a la especie *Candida guilliermondii*. Dichos aislados muestran actividad contra, entre otras, las siguientes especies de hongos patogénicos: *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium expansum* y *Alternaria alternata*. La patente norteamericana US-5041384, que proviene de la misma prioridad que la mencionada solicitud de patente PCT, se centra en la actividad de tres cepas concretas de *Candida guilliermondii*.

La solicitud de patente PCT WO-92/18009 describe también el empleo de levaduras como agentes de control biológico de enfermedades de postcosecha en frutos, citando concretamente aislados de las especies *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida parapsilopsis* y *Candida guilliermondii*. Por último, Wilson, C.L., en la solicitud de patente norteamericana US-7-745796, publicada como documento NTIS (National Technical Information Service) número PB92-102334, describe el empleo como agentes de control biológico, contra las enfermedades postcosecha de frutos tales como manzanas, melocotones y naranjas, de tres cepas concretas de *Candida sake*, aisladas de la piel de tomates, depositadas, de acuerdo con las provisiones del Tratado de Budapest, en The Northern Regional Research Center U.S. Department of Agriculture, Peoria Illinois 61604, con los números de depósito NRRL Y-18844, NRRL Y-18845 y NRRL Y-18846.

No obstante las grandes diferencias de actividad antifúngica que se pueden dar entre aislados o cepas diferentes de levaduras de la misma especie y la falta de datos sobre la efectividad de los mismos en las diferentes condiciones de almacenamiento de los frutos recolectados, hacen que se plantee la necesidad de seguir investigando con el fin de encontrar agentes de control biológico, cada vez más eficaces y de acción más duradera, que

sean capaces de ejercer su acción preventiva en condiciones extremas de almacenamiento.

Objeto de la invención

5

El objeto de la presente invención es proporcionar una nueva cepa de la levadura *Candida sake* capaz de actuar como antagonista altamente efectivo para el control biológico de los hongos patógenos responsables de la podredumbre de la fruta de postcosecha y que mantiene su efectividad en condiciones de baja temperatura y en atmósfera empobrecida en oxígeno.

Otro objeto de la presente invención consiste en la utilización de dicho antagonista para prevenir la podredumbre de la fruta recolectada, durante su almacenamiento.

Todavía otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar un método para la mejor conservación de la fruta recolectada en diferentes condiciones de almacenamiento.

Breve descripción de los dibujos

Se adjuntan a la presente descripción, para una mejor comprensión de la misma, pero sin efectos limitativos, siete hojas con dibujos de los que, a continuación, se expone una breve descripción.

La **figura 1** es una representación gráfica de la curva de crecimiento de la cepa CECT-10817, en medio NYDB, en condiciones de baja temperatura.

La **figura 2** es una representación gráfica de la curva de crecimiento de la cepa CECT-10817, en medio NYDB, a las temperaturas de 15° C, 26° C y 30° C.

La **figura 3** es una representación gráfica de la curva de crecimiento de la cepa CECT-10817, en medio NYDB, a las temperaturas de 34° C y 37° C.

La figura 4 es una representación gráfica del desarrollo de la población de la cepa CECT-10817 sobre manzana "Golden Delicious" a 25° C de temperatura.

La figura 5 es una representación gráfica del desarrollo de la población de la cepa CECT-10817 sobre manzana "Golden Delicious" en condiciones de frigoconservación: en frío convencional (a 1° C de temperatura, y con una atmósfera con un contenido en oxígeno del 21%); en atmósfera controlada (a 1° C de temperatura, y con una atmósfera con un contenido en oxígeno del 3%); y en atmósfera controlada a ultrabajo oxígeno (a 1° C de temperatura, y con una atmósfera con un contenido en oxígeno del 1%).

La figura 6 es una representación en forma de diagrama de barras tridimensional de los porcentajes de reducción de la podredumbre, en manzanas "Golden Delicious" inoculadas con *Botrytis cinerea*, causados por la inoculación del antagonista CECT-10817. Datos obtenidos después de seis días de incubación a 20° C.

La figura 7 es una representación en forma de diagrama de barras tridimensional de los porcentajes de reducción de la podredumbre, en manzanas "Golden Delicious" inoculadas con *Penicillium expansum*, causados por la inoculación del antagonista CECT-10817. Datos obtenidos después de siete días de incubación a 20° C.

La figura 8 es una representación en forma de diagrama de barras tridimensional de los porcentajes de reducción de la podredumbre, en manzanas "Golden Delicious" inoculadas con *Rhizopus nigricans*, causados por la inoculación del antagonista CECT-10817. Datos obtenidos después de seis días de incubación a 20° C.

La figura 9 es una representación en forma de diagrama de barras tridimensional de los porcentajes de reducción de la podredumbre, en manzanas "Golden Delicious" inoculadas con *Penicillium expansum*, causados por la inoculación del antagonista CECT-10817. Datos obtenidos des-

pués de sesenta días de incubación en condiciones de frigoconservación: en frío convencional (a 1° C de temperatura, y con una atmósfera con un contenido en oxígeno del 21%); en atmósfera controlada (a 1° C de temperatura, y con una atmósfera con un contenido en oxígeno del 3%); en atmósfera controlada a ultrabajo oxígeno (a 1° C de temperatura, y con una atmósfera con un contenido en oxígeno del 1%).

La figura 10 es una representación en forma de diagrama de barras tridimensional de los porcentajes de reducción de la podredumbre, en manzanas "Golden Delicious" inoculadas con *Botrytis cinerea*, causados por la inoculación del antagonista CECT-10817. Datos obtenidos después de sesenta días de incubación en condiciones de frío convencional (a 1° C de temperatura, y con una atmósfera con un contenido en oxígeno del 21%).

La figura 11 es una representación en forma de diagrama de barras tridimensional de los porcentajes de reducción de la podredumbre, en manzanas "Golden Delicious" inoculadas con *Penicillium expansum*, causados por el baño de los frutos con el antagonista CECT-10817. Datos obtenidos después de sesenta días de ensayo a gran escala en condiciones de frío convencional (a 1° C de temperatura, y con una atmósfera con un contenido en oxígeno del 21%).

La figura 12 es una representación en forma de diagrama de barras tridimensional de los porcentajes de reducción de la podredumbre, en manzanas "Golden Delicious" inoculadas con *Penicillium expansum*, causados por la pulverización con 7×10^6 u.f.c./ml del antagonista CECT-10817 y por la aplicación del fungicida químico Imazalil a una concentración del 7,5%. Datos comparativos obtenidos después de ocho días de incubación a 20° C de temperatura.

La figura 13 es una representación gráfica de la evolución de la población del antagonista CECT-10817 sobre manzana "Golden Delicious", aplicado en el campo

mediante pulverización, a lo largo del proceso de recolección, manipulación y conservación en condiciones de frío convencional (a 1° C de temperatura, y con una atmósfera con un contenido en oxígeno del 21%).

5

Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han logrado aislar una nueva cepa de la especie *Candida sake* (Saito and Ota) van Uden and Buckley que muestra una efectividad muy elevada como antagonista de las especies de hongos causantes de las enfermedades de las frutas de postcosecha, en una amplia gama de temperaturas y atmósferas de oxígeno, lo que permite su utilización industrial para el control biológico de dichas especies fúngicas y prevenir la podredumbre de la fruta en condiciones de almacenamiento.

La cepa objeto de la presente invención se ha aislado de la superficie de manzanas, mediante repetidos lavados con agua estéril, y se ha depositado un cultivo de la misma, de acuerdo con las provisiones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento del depósito de microorganismos para el propósito del procedimiento de patentes, en la autoridad internacional de depósito Colección Española de Cultivos Tipo, con domicilio en la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, 46100 Burjasot (Valencia) España, que le ha asignado el número de depósito CECT-10817.

El aislado de CECT-10817 fue identificado como *Candida sake* por el "Centraalbureau voor Schimmelcultures" de Holanda y, tras su aislamiento, se cultivó en el medio NYDA, consistente en extracto de levadura, dextrosa y agar, y en el medio NYDB, consistente en caldo de extracto de levadura y dextrosa. El aislado de CECT-10817 forma colonias de color blanco-cremoso, redondas, bien definidas, con borde liso y con una ligera elevación central,

observándose pseudohifas en los cultivos.

La cepa CECT-10817 presenta las características bioquímicas que se detallan en las tablas I y II.

5

Tabla I. Ensayos de oxidación

	Gentibiosa	+(F)	Ac. D-Gluónico	-	N-Acetil-D-Glucosa- mina	-
	Melibiosa	+(F)	Dextrina	-	alfa-D-Glucosa	-
10	L-Prolina	+	Inulina	-	D-Galactosa	-
	Furanosa	+	Celibiosa	-	D-Psicosa	-
	Salicina	+	Maltosa	-	L-Sorbosa	-
	Ac. Acético	-	Maltotriosa	-	D-Manitol	-
	Ac. Fumárico	-	Melezitosa	-	D-Sorbitol	-
15	Ac. propiónico	-	Palatinosa	-	D-Arabitol	-
	Ac. succínico	-	D-Rafinosa	-	Xylitol	-
	Metil succinato	-	Stachyosa	-	Glycerol	-
	Ac. L-Aspártico	-	Sucrosa	-		
	Ac. L-Glutámico	-	Trehalosa	-		
20	+(F) : coloración intensa + : coloración - : ausencia de coloración					

25

30

35

Tabla II. Ensayos de asimilación

	Maltotriosa	+	Inulina	-	Salicina	-
	Sucrosa	+	Cellobiosa	-	Maltitol	-
5	Trehalosa	+	Gentibiosa	-	D-Sorbitol	-
	Furanosa	+	Melezitosa	-	i-Eritritol	-
	Manitol	+	Melibrosa	-	Glycerol	-
	D-Arabitol	+	Palatinosa	-	L-Arabinosa	-
10	Metil Succinato	+	Rafinosa	-	D-Arabinosa	-
	Ac. Málico	+	Stachyosa	-	D-Ribosa	-
	Maltosa	+	Turanosa	-	Metil succinato + D-Xylosa	-
	Adonitol	+	N-acetil-D-Glucosa- mina	-	Ac. Quínico + D-Xylosa	-
15	Xylitol	+	D-glucosamina	-	Ac. D-glucurónico + D-xylosa	-
	Xylosa	+	alfa-D-Glucosa	-	Dextrina + D-Xylosa	-
	Ac. Fumárico	-	D-Galactosa	-	alfa-D-Lactosa + D-Xylosa	-
20	Ac. Bromosuccínico	-	D-Psicosa	-	alfa-D-Melibiosa + D-Xylosa	-
	Ac. L-Glutámico	-	L-Manosa	-	D-Galactosa + D-Xylosa	-
	Ac. alfa-aminobutírico	-	L-Sorbosa	-	m-Inositol + D-Xylosa	-
	Ac. alfa-Ketoglutárico	-	alfa-metil-D-Glucó- sido	-	1,2-propanodiol + D-Xylosa	-
25	Ac. 2-Keto-D-glucóni- co	-	beta-metil-D-Glucó- sido	-	Acetoina + D-Xylosa	-
	Ac. D-glucónico	-	Amygdalina	-		
	Dextrina	-	Arbutina	-		
30	+ : coloración - : ausencia de coloración					

Además, la cepa CECT-10817 resulta resistente al antibiótico sulfato de estreptomina, a una concentración de 0,5 g/ml.

El crecimiento "in vitro" del microorganismo de la cepa CECT-10817, en medio NYDB, a pH 7, se produce, en

condiciones aeróbicas, en un amplio margen de temperaturas de incubación, mostrando un crecimiento satisfactorio a las temperaturas comprendidas entre 1° C y 34° C. Como se observa en las figuras 1, 2 y 3, el máximo poblacional se alcanza a 1° C, siendo éste muy superior al producido en cualquiera de las otras temperaturas estudiadas.

Tal como muestran los gráficos de las figuras 4 y 5, la inoculación del microorganismo en fruta muestra un gran crecimiento en condiciones aeróbicas, tanto a temperatura ambiente (25° C) como a la temperatura de 1° C, ya sea en atmósfera ambiente (21% de oxígeno) o en atmósfera controlada de 3% de oxígeno y de 1% de oxígeno (ultra bajo oxígeno), que son propias de las condiciones de almacenamiento en las centrales hortofrutícolas.

El aislado CECT-10817 se puede obtener, tanto a nivel de laboratorio como para su uso industrial, mediante su cultivo en un medio apropiado, por medio de técnicas convencionales suficientemente conocidas por el experto. Por ejemplo, se puede obtener mediante el cultivo de la cepa original en medio NYDB, a pH 7, en un recipiente provisto de agitación y aireación, a temperaturas comprendidas entre 1° C y 34° C, durante períodos de tiempo del orden de 20 a 50 horas. El máximo poblacional, para el medio NYDB, se alcanza a las 37 horas a 25° C. Una vez finalizado el período de incubación, se procede a separar los microorganismos del medio de cultivo mediante técnicas convencionales de sedimentación, centrifugación o filtrado, y el cultivo se puede conservar, por ejemplo, mediante congelación con gel de sílice.

El antagonista CECT-10817 se puede aplicar a la superficie de los frutos mediante cualquier técnica convencional. Por ejemplo, se puede preparar una dispersión del cultivo en agua y proceder a la pulverización o ducha del fruto en el campo antes de la recolección, o bien efectuar el tratamiento durante el proceso de manipula-

ción del fruto recolectado, antes de proceder al almacenamiento, en cuyo caso el tratamiento se puede realizar también por inmersión.

5 Tal como se observa en la figura 13, cuando el tratamiento de los frutos se efectúa mediante pulverización de los mismos en el árbol, el aislado de CECT-10817 mantiene su viabilidad e incluso aumenta su población en la superficie del fruto a lo largo del proceso de recolección y almacenamiento.

10 Las concentraciones efectivas del antagonista CECT-10817 en la dispersión de aplicación para el tratamiento de las frutas pueden ser variables en función de factores tales como el tipo de fruto, la madurez del mismo, la concentración del hongo patógeno en el fruto, el tipo de
15 herida o lesión que afecte al fruto, la temperatura y humedad de la conservación, etc. Habitualmente el rango de concentraciones efectivas oscila entre 10^5 y 10^7 u.f.c./ml (unidades formadoras de colonias por mililitro), pero dichos márgenes no deben ser considerados como limitativos
20 del objeto de la presente invención.

El aislado de CECT-10817 es muy efectivo en el control biológico de un gran número de especies de hongos patógenos de las frutas que incluyen, pero no se limitan, a *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus*
25 *nigricans*. Su efectividad en la prevención de la podredumbre de la fruta no se limita al almacenamiento de la misma en condiciones de temperatura y concentración de oxígeno ambientales, sino que, debido a las características del microorganismo ya comentadas anteriormente, su
30 empleo da también excelentes resultados en condiciones de almacenamiento de frigoconservación y atmósfera controlada, habitualmente utilizadas por las centrales hortofrutícolas industriales.

La efectividad del aislado CECT-10817 en el control de los hongos patógenos es comparable a la del
35 fungicida Imazalil, producto químico derivado del imidazol

(1-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(2-propeniloxi)etil]-1H-imidazol), uno de los fungicidas más empleado en el mundo en postcosecha de frutos, lo que supone que el aislado CECT-10817 constituye una alternativa eficaz para dicho
5 producto químico, con la ventaja de carecer de las características de toxicidad del mismo.

El aislado CECT-10817 puede ser empleado con efectividad para combatir la podredumbre de todo tipo de frutos en cualquiera de sus variedades, especialmente
10 los frutos de pepita, tales como manzanas, peras y membrillos; los cítricos, tales como naranjas, limones y mandarinas; los de hueso, tales como melocotones, albaricoques y ciruelas; y otros frutos tales como, por ejemplo, las fresas.

15 Los autores de la presente invención no tienen conocimiento de que, hasta la presente invención, se hubiera descrito ningún agente de control biológico antagonista específico contra los hongos patógenos de la especie *Rhizopus nigricans*. Dicha especie resulta muy
20 agresiva en términos patológicos, ya que posee enzimas pectinolíticos que le permiten degradar el tejido del fruto sin que la infección precise de heridas o lesiones para iniciarse. Por ello puede ser causa de podredumbre en frutos sanos en caso de contacto de los mismos con
25 frutos afectados (efecto nido). Además, la podredumbre que causa dicha especie es de desarrollo rápido y se caracteriza porque los tejidos del fruto se vuelven muy acuosos y blandos por lo que, al desprenderse un gran volumen de líquido contaminado, la infección se extiende
30 con facilidad al resto de cajas almacenadas. Por estos motivos, la presencia de *Rhizopus nigricans* en una cámara frigorífica industrial produce unos porcentajes de podredumbre muy elevados. Por otra parte, tampoco existe, que conozcan los autores de la presente invención, ningún
35 fungicida químico específico contra *Rhizopus nigricans*.

Esta situación hace que, por ejemplo en España,

país con una elevada producción hortofrutícola, los hongos de la especie *Rhizopus nigricans* se estén convirtiendo en unos de los patógenos más peligrosos, causantes de graves pérdidas en la postcosecha de frutas de pepita.

5 Es de resaltar, en consecuencia, que el antagonista CECT-10817, objeto de la presente invención, constituye el primer tratamiento eficaz descrito para combatir los efectos perniciosos producidos por los hongos de la mencionada especie *Rhizopus nigricans*.

10

Ejemplos

Los ejemplos que se exponen a continuación se deben interpretar como un medio auxiliar para una mejor
15 comprensión de la invención y no como limitaciones al objeto de la misma.

Ejemplo 1. Obtención de una dispersión acuosa de CECT-10817

20 Se sembró el antagonista CECT-10817 en un tubo de ensayo con medio NYDA y se incubó a 25° C durante 24-48 horas. Seguidamente, a partir de dicho tubo de ensayo, se sembró en un matraz Erlenmeyer con 50 ml de medio NYDB que se incubó en un agitador orbital a 150 rpm y a 25° C
25 durante 24 horas. A continuación se centrifugó el contenido del matraz a 6.000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento se dispersó en 50 ml de agua destilada estéril y, a partir de dicha dispersión, se prepararon las concentraciones deseadas del antagonista mediante el cálculo de la transmitancia de la
30 suspensión microbiana en un espectrofotómetro, como medida indirecta de la concentración del antagonista. La equivalencia entre la transmitancia y la concentración de microorganismos se efectuó mediante una cámara Thoma
35 de recuento de microorganismos. Las concentraciones se expresan en u.f.c./ml (unidades formadoras de colonias

por mililitro).

Ejemplo 2. Efectividad de CECT-10817 en frutos almacenados a temperatura ambiente

5 El ensayo se realizó en manzanas "Golden Delicious" sanas que fueron limpiadas con agua y dejadas secar y en las que se realizaron dos perforaciones por cada manzana de dimensiones 3x3x3 mm aproximadamente. Las dos incisiones se situaron en la misma cara de la manzana, localizadas una en la parte superior y otra en la inferior.
10 La unidad de muestra estaba formada por tres manzanas y por cada tratamiento se realizaron tres repeticiones.

Las tres especies fúngicas patógenas ensayadas fueron *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus nigricans* y la titulación de las suspensiones de esporas de las mismas se realizó a partir de cultivos jóvenes de 15 5-7 días, sembrados en medio PDA (patata, dextrosa y agar), e incubados a 28° C de temperatura, mediante el raspado de las colonias en agua destilada estéril con Tween 80. A continuación se procedió al recuento de esporas en cámara Thoma, fijándose la concentración deseada, expresada en u.f.c./ml.
20

Lotes de tres manzanas preparadas como se ha explicado anteriormente se inocularon con 25 µl de la suspensión de antagonista CECT-10817, a las concentraciones de 2,62 x 10⁶ u.f.c./ml, 7,0 x 10⁶ u.f.c./ml 1,15 x 10⁷ u.f.c./ml. Una vez secas las frutas, se procedió a la inoculación de 20 µl de las suspensiones tituladas de patógenos de las tres especies seleccionadas, a las concentraciones de 10³ u.f.c./ml, 10⁴ u.f.c./ml y 10⁵ u.f.c./ml. Paralelamente se preparó la prueba control en donde únicamente se inocularon manzanas con la suspensión titulada de patógeno y agua destilada estéril.
30

Todas las frutas tratadas se colocaron en alveolos, se dejaron secar y se colocaron en cajas para su incubación a 20° C, en atmósfera ambiente. Para las frutas inocula-
35

das con *Penicillium expansum* el tiempo de incubación fue de siete días, para *Botrytis cinerea* de 6 días y para *Rhizopus nigricans* de 5 días. El período de incubación se fijó en base al tiempo que se precisa para que las manzanas control presenten diámetros de podredumbre grandes. Tras dicho período de incubación se procedió a la lectura de los resultados, midiendo los diámetros de podredumbre de todas las perforaciones realizadas.

Los datos de lectura del diámetro de podredumbre de las diferentes repeticiones se sometieron a un análisis estadístico consistente en efectuar un análisis de la varianza y, una vez comprobado que dicho análisis de varianza resultaba significativo ($\alpha < 0,01$ a $\alpha < 0,05$), se efectuó una separación de medias de acuerdo con la Prueba de Rango Múltiple de Duncan, cuyos resultados se expresan con las letras del alfabeto minúsculas (a, b, c, d, ...), de manera que tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales y tratamientos con letras diferentes son estadísticamente diferentes.

En la tabla III se exponen los resultados obtenidos en el caso del control biológico de *Botrytis cinerea*, en la tabla IV en el de *Penicillium expansum*, y en la V en el de *Rhizopus nigricans*.

La expresión gráfica de los resultados de dichas tablas se encuentran, respectivamente, en las figuras 6, 7 y 8.

30

35

Tabla III. Control de CECT-10817 sobre *B. cinerea*

CONCENTRAC. u.f.c./ml <i>Botrytis cinerea</i>	MEDIDA	DOSIS CECT - 10817 u.f.c./ml			
		CONTROL 0	2,62 . 10 ⁶	7,0 . 10 ⁶	1,15 . 10 ⁷
10 ³	DIAMET. MEDIO PODREDUMBRE (cm)	0,14 a	0,00 b	0,00 b	0,00 b
	% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	-	100%	100%	100%
10 ⁴	DIAMET. MEDIO PODREDUMBRE (cm)	1,29 a	0,00 b	0,00 b	0,00 b
	% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	-	100%	100%	100%
10 ⁵	DIAMET. MEDIO PODREDUMBRE (cm)	2,08 a	0,58 b	0,00 c	0,00 c
	% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	-	72,18%	100%	100%

Tabla IV. Control de CECT-10817 sobre *P. expansum*

CONCENTRAC. u.f.c./ml <i>Penicillium expansum</i>	MEDIDA	DOSIS CECT - 10817 u.f.c./ml			
		CONTROL 0	2,62 . 10 ⁶	7,0 . 10 ⁶	1,15 . 10 ⁷
10 ³	DIAMET. MEDIO PODREDUMBRE (cm)	1,64 a	0,11 b	0,00 b	0,00 b
	% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	-	93,25%	100%	100%
10 ⁴	DIAMET. MEDIO PODREDUMBRE (cm)	2,34 a	1,08 b	0,45 c	0,64 c
	% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	-	53,70%	80,76%	72,68%
10 ⁵	DIAMET. MEDIO PODREDUMBRE (cm)	2,65 a	1,74 b	0,73 c	0,76 c
	% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	-	34,38%	72,53%	71,28%

Tabla V. Control de CECT-10817 sobre *R. nigricans*

CONCENTRAC. u.f.c./ml <i>Rhizopus nigricans</i>	MEDIDA	DOSIS CECT - 10817 u.f.c./ml			
		CONTROL 0	2,62 . 10 ⁶	7,0 . 10 ⁶	1,15 . 10 ⁷
5 10 ³	DIAMET. MEDIO PODREDUMBRE (cm)	6,05 a	0,22 b	0,00 b	0,00 b
	% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	-	96,41%	100%	100%
10 ⁴	DIAMET. MEDIO PODREDUMBRE (cm)	7,38 a	1,58 b	0,20 c	0,00 c
	% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	-	78,63%	97,29%	100%
15 20	DIAMET. MEDIO PODREDUMBRE (cm)	8,07 a	2,01 b	0,10 c	0,22 c
	% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	-	75,09%	98,76%	97,31%

Los datos recogidos en las mencionadas tablas III, IV y V. así como su representación gráfica en las figuras 6, 7 y 8, muestran la alta efectividad del antagonismo CECT-10817 en el control de las tres especies de hongos patógenos ensayados y, en consecuencia, en la prevención de la podredumbre de las frutas.

Si se efectúa una comparación de los resultados obtenidos con lo descrito en la solicitud de patente norteamericana US-7-745796 (Wilson), anteriormente mencionada, resulta especialmente significativo el hecho de que la eficacia de la cepa de *Candida sake* CECT-10817 resulta ser claramente superior, en el caso del control de las especies *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*, a la mostrada por las cepas de *Candida sake* NRRL Y-18844, NRRL Y-18845 y NRRL Y-18846 descritas en dicha

solicitud de patente.

5 Ejemplo 3. Efectividad de CECT-10817 en frutos almacenados a bajas temperaturas y diferentes atmósferas de oxígeno.

Siguiendo el método de trabajo explicado en el ejemplo 2, se efectuaron ensayos con veinte manzanas "Golden Delicious" por repetición y tres repeticiones por tratamiento.

10 Se inocularon 25 µl de dispersión acuosa del antagonista CECT-10817, a las tres concentraciones empleadas en el ejemplo 2, y 20 µl de inóculo de *Penicillium expansum*, a la concentración de 10^4 u.f.c./ml. A continuación se separaron tres lotes de manzanas inoculadas,
15 y se almacenaron durante sesenta días: un lote en condiciones de frío convencional (1° C y oxígeno ambiente), otro lote en condiciones de atmósfera controlada (1° C y 3% de oxígeno) y el último lote en condiciones de ultrabajo oxígeno (1° C y 1% de oxígeno).

20 Los resultados se leyeron y trataron estadísticamente de la misma manera que en el ejemplo 2 y se exponen en las tablas VI, VII y VIII. Su representación gráfica conjunta se expone en la figura 9.

25 **Tabla VI. Almacenamiento a 1° C y 21% O₂**

MEDIDA	DOSIS CECT - 10817 u.f.c./ml			
	CONTROL 0	$2,62 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$	$1,15 \cdot 10^7$
30 DIAMET. MEDIO PODREDUMBRE (cm)	3,92 a	2,01 b	1,45 bc	1,11 c
% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	—	48,59%	62,96%	71,74%

Tabla VII. Almacenamiento a 1° C y 3% O₂

MEDIDA	DOSIS CECT - 10817 u.f.c./ml			
	CONTROL 0	2,62 . 10 ⁶	7,0 . 10 ⁶	1,15 . 10 ⁷
DIAMET. MEDIO PODREDUMBRE (cm)	4,13 a	0,89 b	0,42 c	0,10 d
% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	-	78,30%	89,79%	97,45%

Tabla VIII. Almacenamiento a 1° C y 1% O₂

MEDIDA	DOSIS CECT - 10817 u.f.c./ml			
	CONTROL 0	2,62 . 10 ⁶	7,0 . 10 ⁶	1,15 . 10 ⁷
DIAMETRO MEDIO PODREDUMBRE (cm)	2,87 a	1,30 b	0,84 bc	0,62 c
% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	-	64,05%	70,05%	78,43%

Como se observa en las tablas anteriores y en la figura 9, los resultados obtenidos muestran un elevado grado de eficacia en el control de *P. expansum* en condiciones de frío convencional y dicha eficacia todavía se ve sensiblemente aumentada cuando los ensayos se efectúan en almacenamiento a baja temperatura y condiciones de atmósfera baja en oxígeno.

30

Ejemplo 4. Control de *B. cinerea* en condiciones de frío convencional.

Se efectuó un ensayo, bajo las mismas condiciones del ejemplo 3, utilizando como inóculo de hongo patógeno 20 µl de inóculo de *Botrytis cinerea*, a la concentración de 10⁴ u.f.c./ml. El ensayo se realizó en condiciones de

35

almacenamiento de frío convencional (1° C y oxígeno ambiente).

Los resultados obtenidos, después del tratamiento estadístico ya mencionado, se exponen en la tabla IX y su representación gráfica en la figura 10.

Tabla IX. Control de *B. cinerea* a 1° C y 21% O₂

MEDIDA	DOSIS CECT-10817 u.f.c./ml		
	CONTROL 0	7 . 10 ⁵	7,0 . 10 ⁶
DIAMET. MEDIO PODREDUMBRE (cm)	1,30 a	0,39 b	0,14 b
% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	-	77,7%	89,2%

Los resultados de reducción del diámetro de podredumbre fueron excelentes, sobre todo a una concentración de inhibidor CECT-10817 de 7 x 10⁶ u.f.c./ml.

Ejemplo 5. Control de *Penicillium expansum* en ensayo a gran escala.

Para este ensayo la dispersión de antagonista se preparó, en una escala mayor, de la siguiente manera:

Se sembró el antagonista CECT-10817 en un tubo de ensayo con medio NYDA y se incubó a 25° C durante 24-48 horas. Seguidamente, a partir de dicho tubo de ensayo, se sembró en un fermentador, provisto de agitador y sistema de aireación, con 2.000 ml de medio NYDB y se incubó a 25° C durante 37 horas. A continuación se centrifugó el contenido del fermentador a 6.000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento se dispersó en agua destilada estéril y, a partir de dicha dispersión, se prepararon las concentraciones deseadas del an-

tagonista de la misma manera que en el ejemplo 1.

Se utilizó una caja de manzanas "Golden Delicious" (70 frutos) por repetición y cuatro repeticiones por tratamiento. Las manzanas recogidas en el campo fueron perforadas en su zona ecuatorial (4 heridas por manzana) con un bisturí y se trataron con el antagonista CECT-10817, mediante la introducción de las cajas con los frutos en baños que contenían dispersiones de antagonista a concentraciones de 7×10^5 y 7×10^6 u.f.c./ml. Se utilizó también un lote control sin tratar. A continuación, una vez secas las manzanas, las cajas se introdujeron en un baño con una dispersión titulada de esporas de *Penicillium expansum* a la concentración de 10^4 u.f.c./ml.

Las cajas de manzanas se almacenaron durante sesenta días en condiciones de frío convencional (1° C y oxígeno ambiente), al cabo de los cuales se procedió a la lectura de los resultados en las mismas condiciones y con el mismo tratamiento estadístico que en los ejemplos anteriores.

Los resultados se exponen en la tabla X y su representación gráfica en la figura 11.

Tabla X. Control de *P. expansum* a gran escala

MEDIDA	DOSIS CECT10817 u.f.c./ml		
	CONTROL 0	$7,0 \cdot 10^5$	$7,0 \cdot 10^6$
DIAMETRO MEDIO PODREDUMBRE (cm)	1,20 a	0,51 b	0,14 c
% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	—	57,5%	88,0%

Como se observa en la tabla y figura mencionadas, el ensayo a gran escala permite confirmar los excelentes resultados de control de *P. expansum* obtenidos en los

ensayos anteriores. Es de destacar que la reducción del diámetro de podredumbre es prácticamente del 90% cuando se utiliza una concentración de antagonista CECT-10817 de 7×10^6 u.f.c./ml.

5

Ejemplo 6. Comparación con el fungicida Imazalil.

El ensayo se efectuó con veinte manzanas "Golden delicious" por repetición y tres repeticiones por tratamiento y en cada fruto se efectuaron cinco perforaciones.

10

Tanto el antagonista CECT-10817 como el fungicida Imazalil se aplicaron mediante baño de los frutos en soluciones o dispersiones de los mismos. El antagonista se aplicó a una concentración de 7×10^6 u.f.c./ml y el Imazalil a una concentración del 7,5% en peso.

15

A continuación las manzanas se inocularon con el patógeno de la especie *Penicillium expansum* a una concentración de 10^4 u.f.c./ml. En un lote de las manzanas tratadas con el antagonista la inoculación del patógeno se efectuó 24 horas después del tratamiento.

20

Los frutos se incubaron a 20° C durante ocho días, al cabo de los cuales se procedió a la lectura de los resultados y a su tratamiento estadístico.

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla XI y su representación gráfica en la figura 12.

25

Tabla XI. Control de *P. expansum*, comparación con Imazalil

MEDIDA	TRATAMIENTO			
	CONTROL	IMAZALIL (Dosis=7,5%)	CECT-10817 ($7,0 \cdot 10^6$ u.f.c./ml)	CECT-10817 +24 horas ($7,0 \cdot 10^6$ u.f.c./ml)
DIAMET. MEDIO PODREDUMBRE (cm)	2,489 a	0,046 c	1,046 b	0,041 c
% REDUCCION DIAMETRO PODREDUMBRE	-	98,15%	59,42%	98,30%

35

Se observa que, cuando la inoculación del patógeno se produce a las 24 horas del tratamiento, la efectividad del antagonista CECT-10817 y del imazalil son prácticamente iguales.

5

Información sobre el depósito de la cepa CECT-10817

El depósito del microorganismo se ha efectuado, de acuerdo con las provisiones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento del depósito de microorganismos para el propósito del procedimiento de patentes, en la autoridad internacional de depósito Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con residencia en el Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, 46100 Burjasot (Valencia). El depósito se efectuó el 6 de julio de 1994 y el CECT le asignó el número de depósito CECT-10817.

El depósito está a disposición del público, bajo las condiciones previstas en el mencionado Tratado de Budapest, si bien dicha disponibilidad no se puede interpretar como una licencia para practicar el objeto de la presente invención infringiendo los derechos del solicitante de la presente patente.

25

30

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. El cultivo biológico substancialmente puro de la cepa de la especie *Candida sake*, depositado con el número CECT-10817.
- 10 2. La utilización del cultivo de la reivindicación 1 como antagonista para el control biológico de los hongos patógenos responsables de la podredumbre de los frutos de postcosecha.
- 15 3. La utilización, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada porque los hongos patógenos pertenecen a cualquiera de las especies *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus nigricans*.
- 20 4. La utilización, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada porque los frutos son de los conocidos como de pepita, especialmente, manzanas, peras y membrillos, en cualquiera de sus variedades.
- 25 5. La utilización, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada porque los frutos son cítricos, especialmente naranjas, limones y mandarinas, en cualquiera de sus variedades.
- 30 6. La utilización, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada porque los frutos son fresas o de los conocidos como de hueso, especialmente, melocotones, albaricoques y ciruelas, en cualquiera de sus variedades.
- 35 7. La utilización del cultivo de la reivindicación 1 como antagonista para el control biológico de los hongos patógenos de los frutos antes de la recolección.

8. Un método para prevenir la podredumbre de los frutos caracterizado porque la fruta se trata, antes o después de su recolección, con un preparado del cultivo de CECT-10817 de la reivindicación 1.

9. Un método, de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque el tratamiento se efectúa por medio de la pulverización, mojado o inmersión de los frutos en o con una dispersión acuosa del antagonista CECT-10817.

10. Un método, de acuerdo con las reivindicaciones 8 y 9, caracterizado porque la concentración del antagonista CECT-10817 en la dispersión acuosa está comprendida entre 10^5 y 10^7 u.f.c./ml.

11. Un método, de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque las condiciones de almacenamiento de los frutos son las de temperatura y atmósfera de oxígeno ambientales.

12. Un método, de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque las condiciones de almacenamiento de los frutos son las de temperatura inferior a 5° C y atmósfera con un contenido de oxígeno inferior al 5%.

30

35

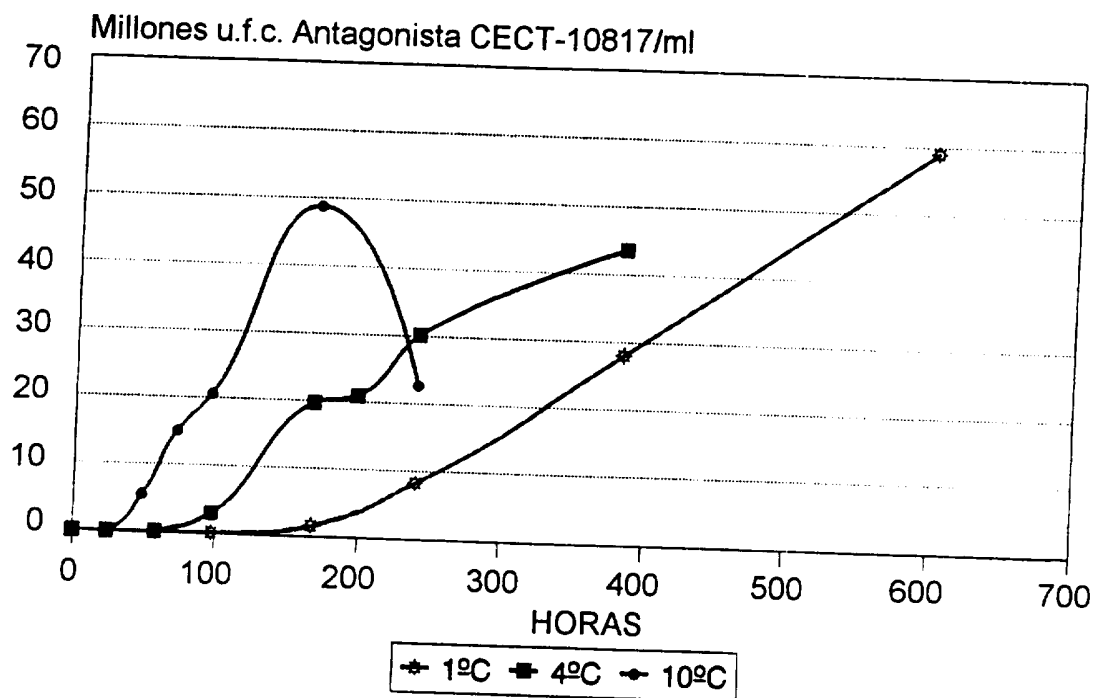


Fig. 1

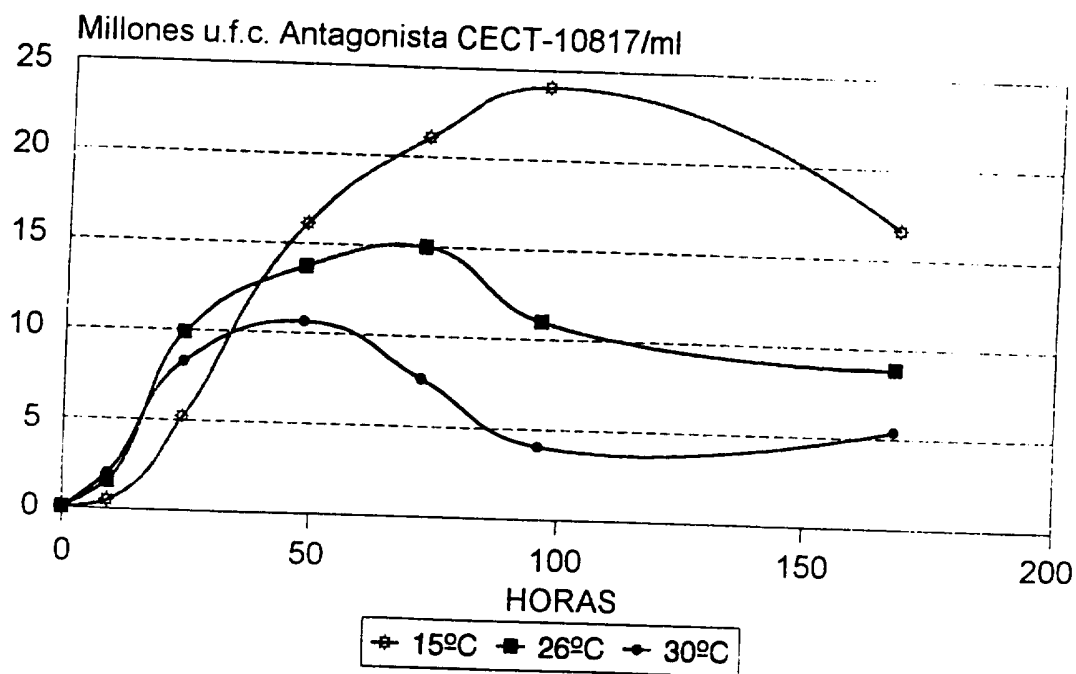


Fig. 2

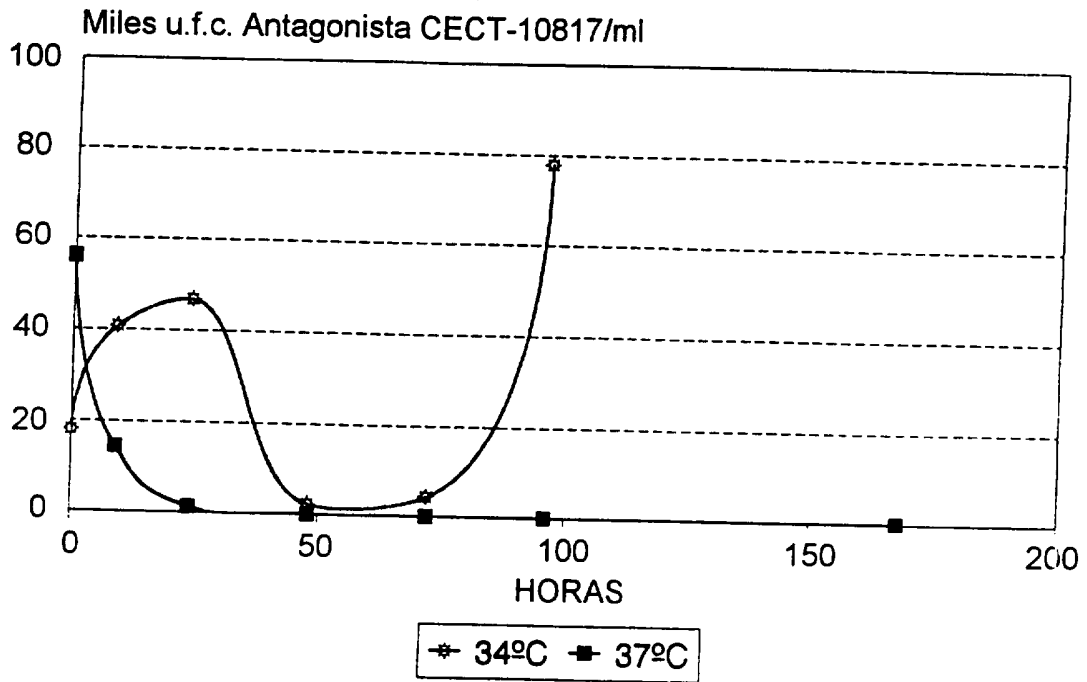


Fig. 3

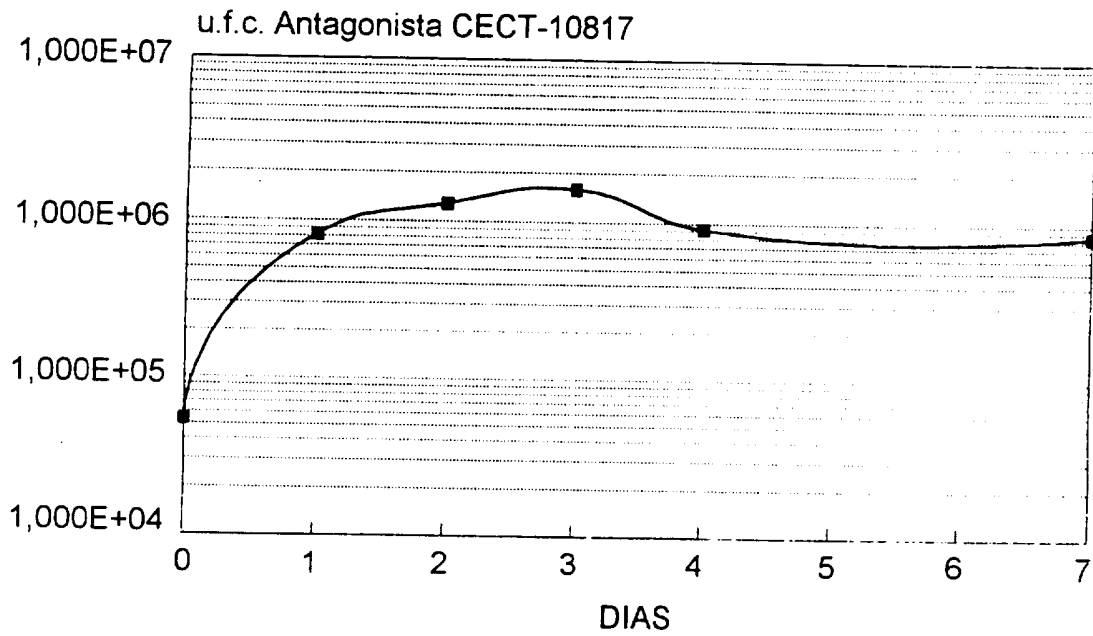


Fig. 4

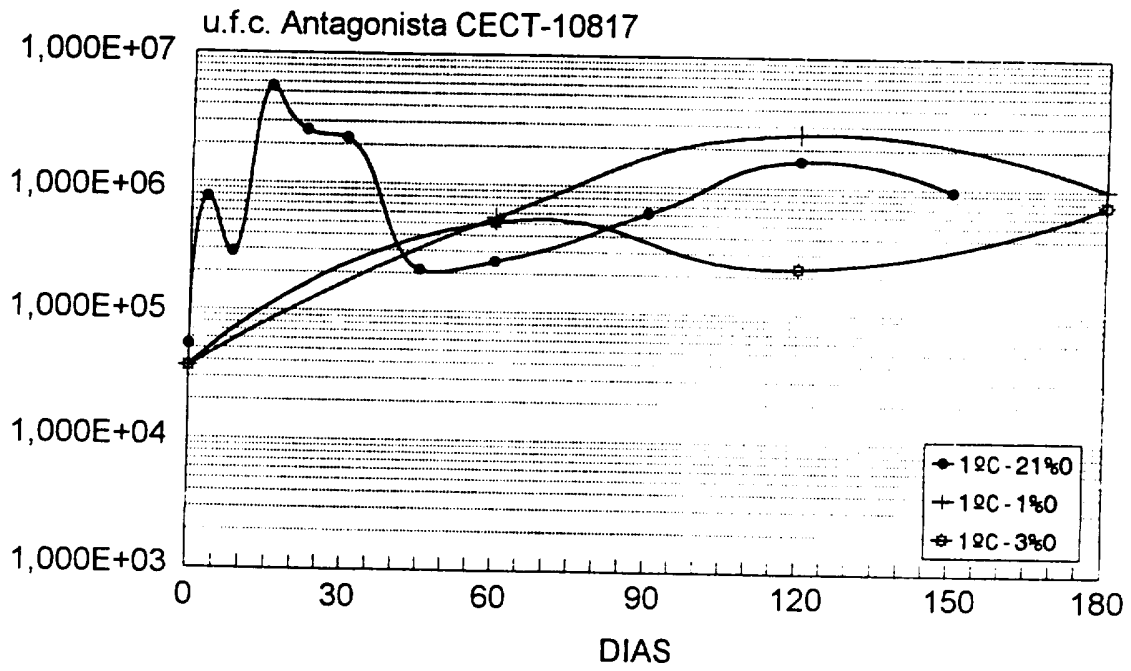


Fig. 5

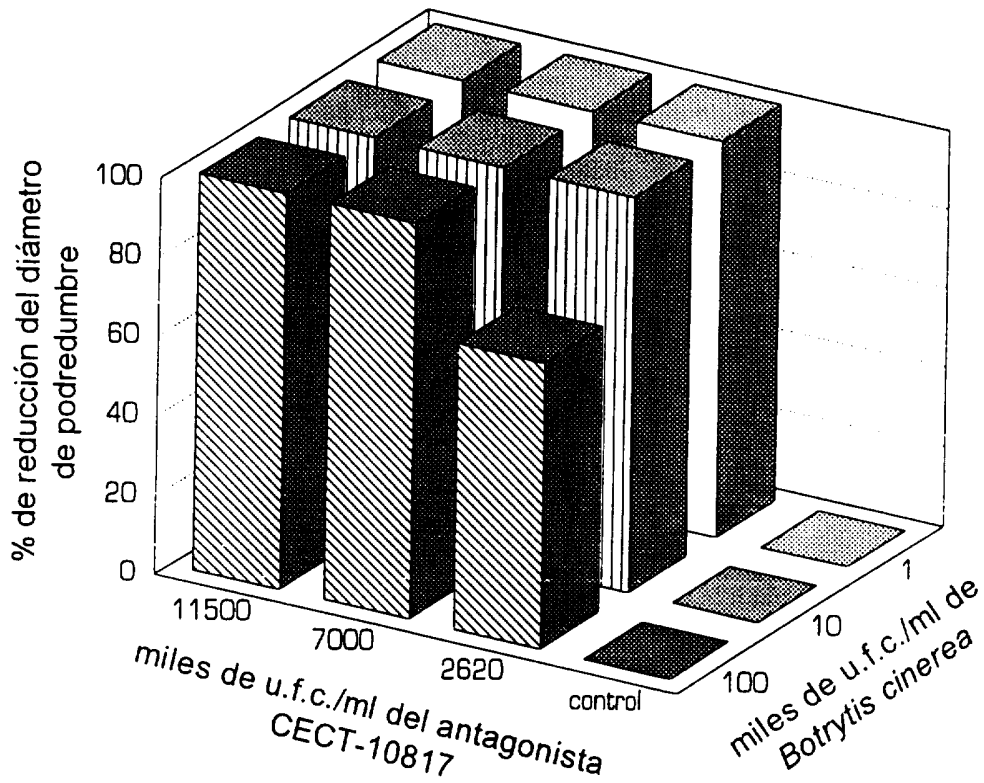


Fig. 6

4 / 7

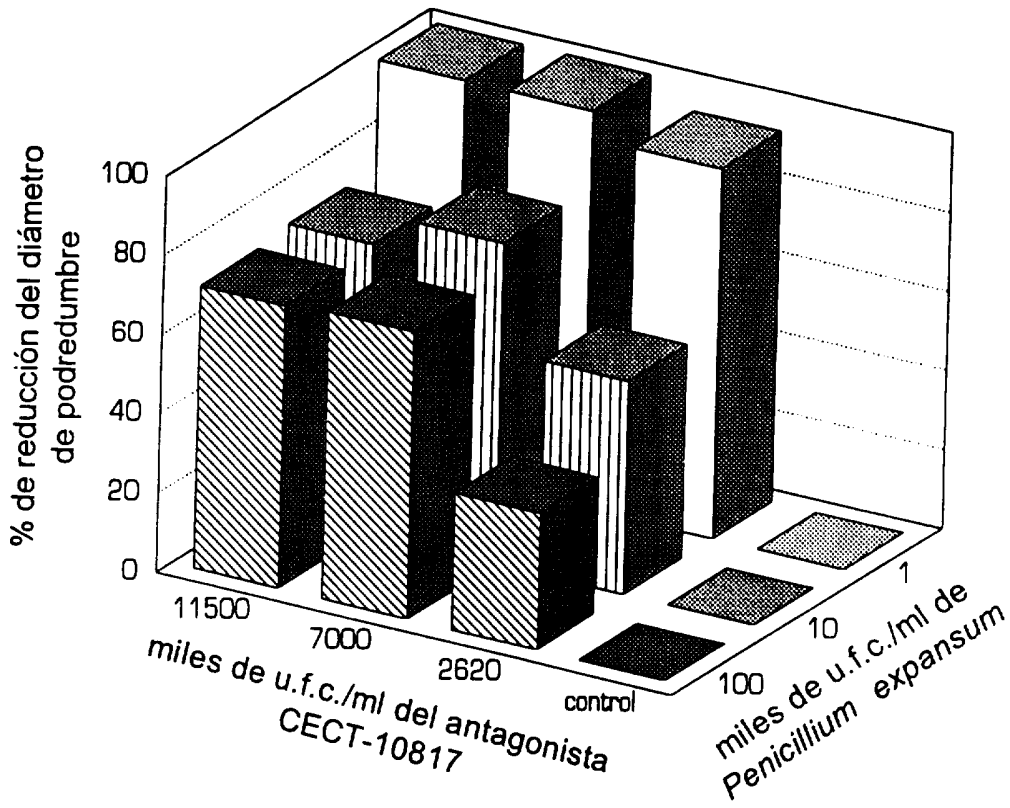


Fig. 7

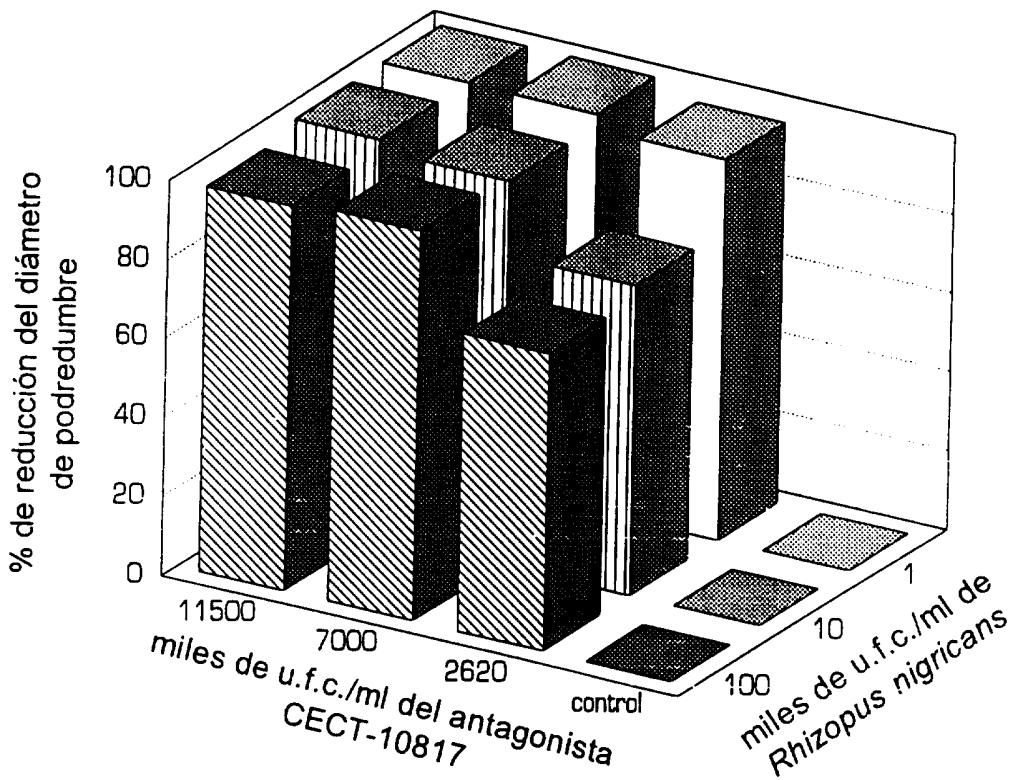


Fig. 8

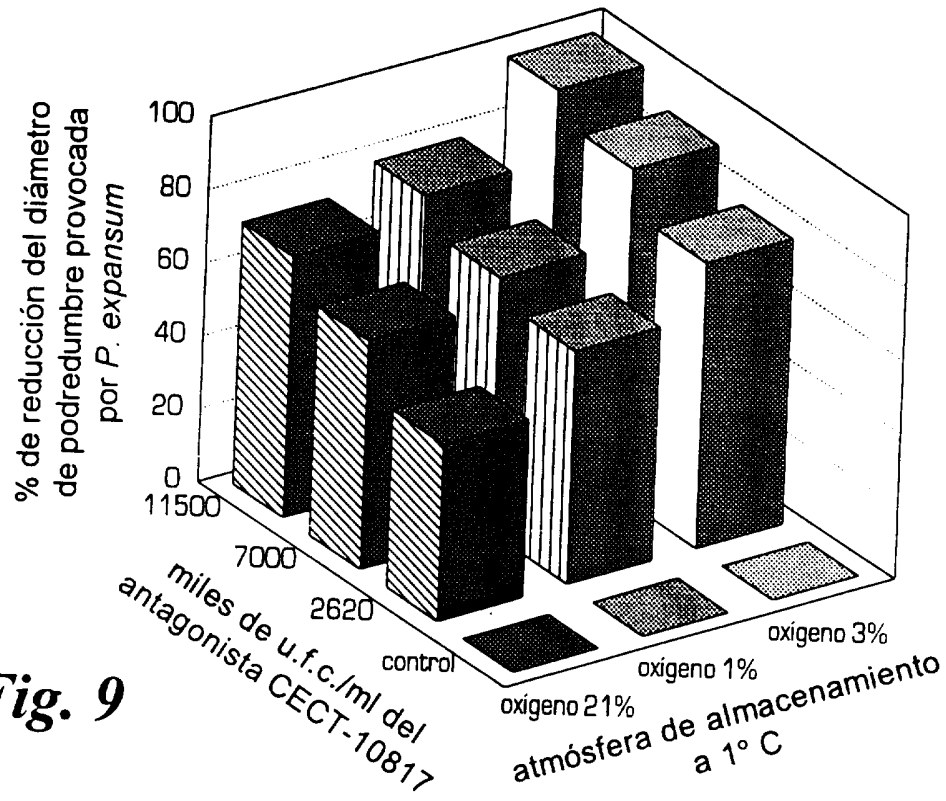


Fig. 9

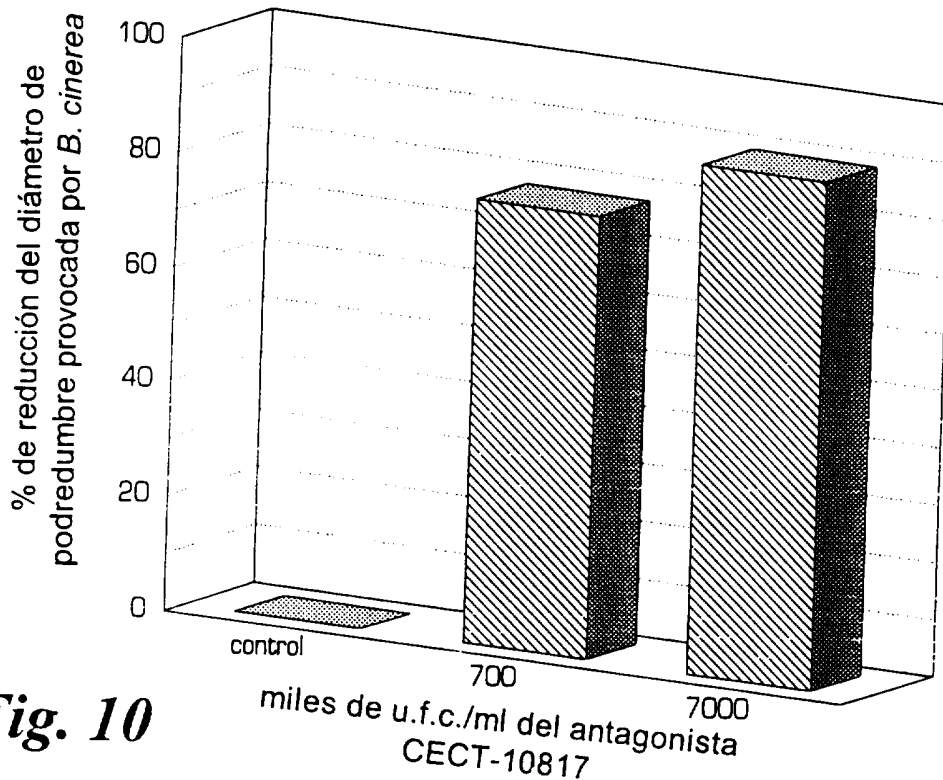


Fig. 10

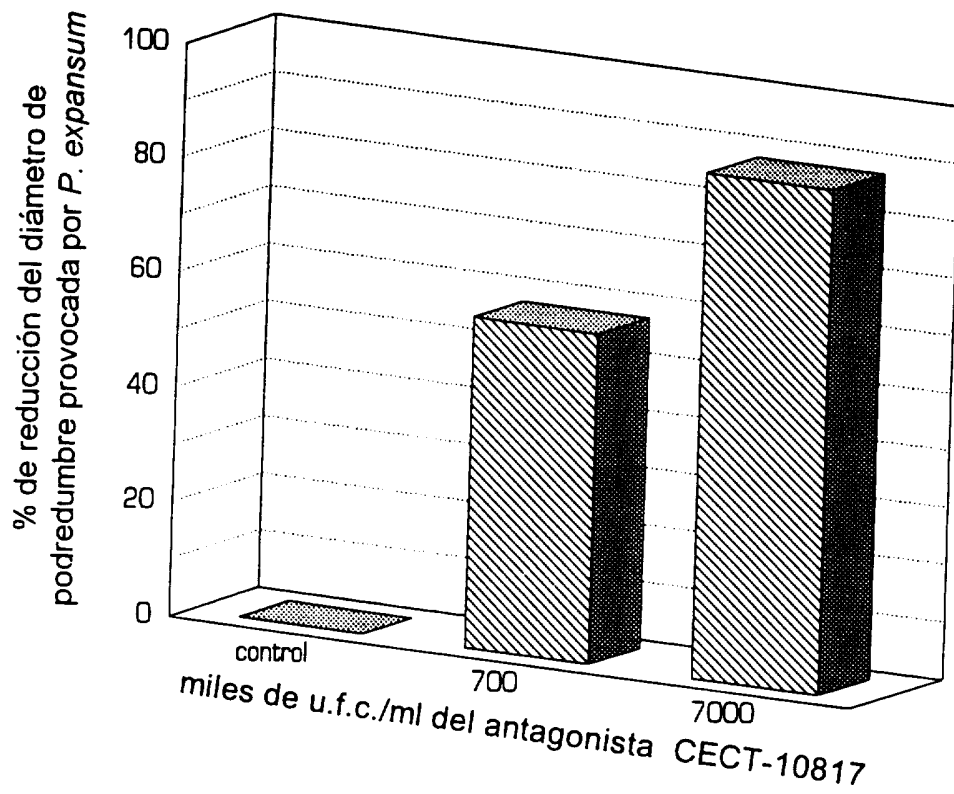


Fig. 11

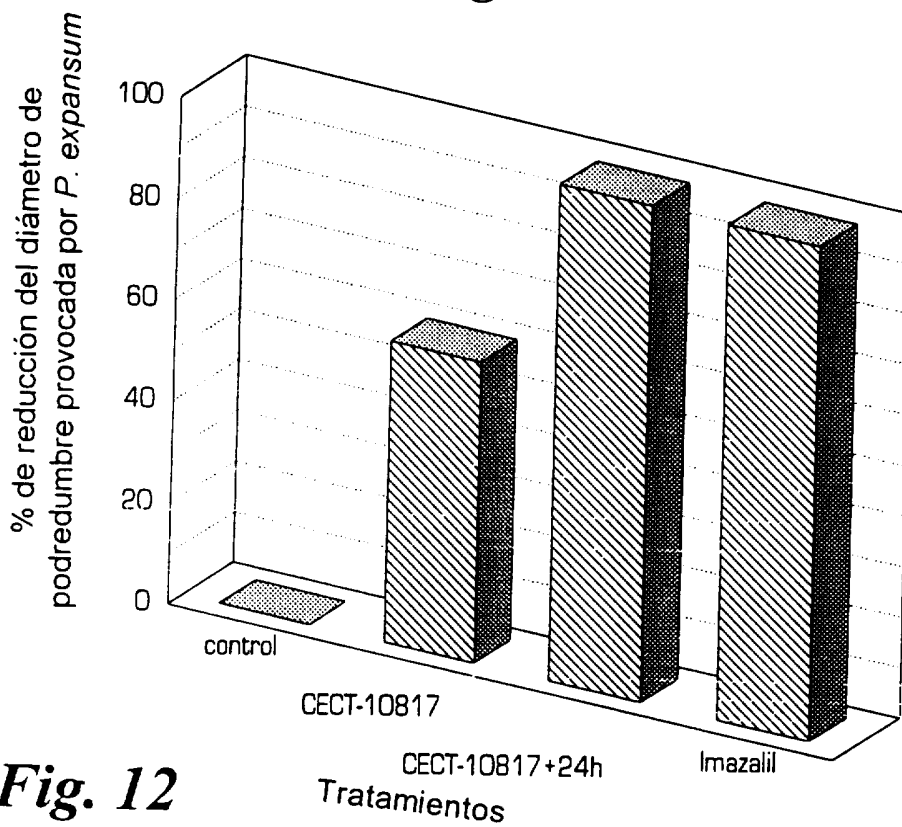


Fig. 12

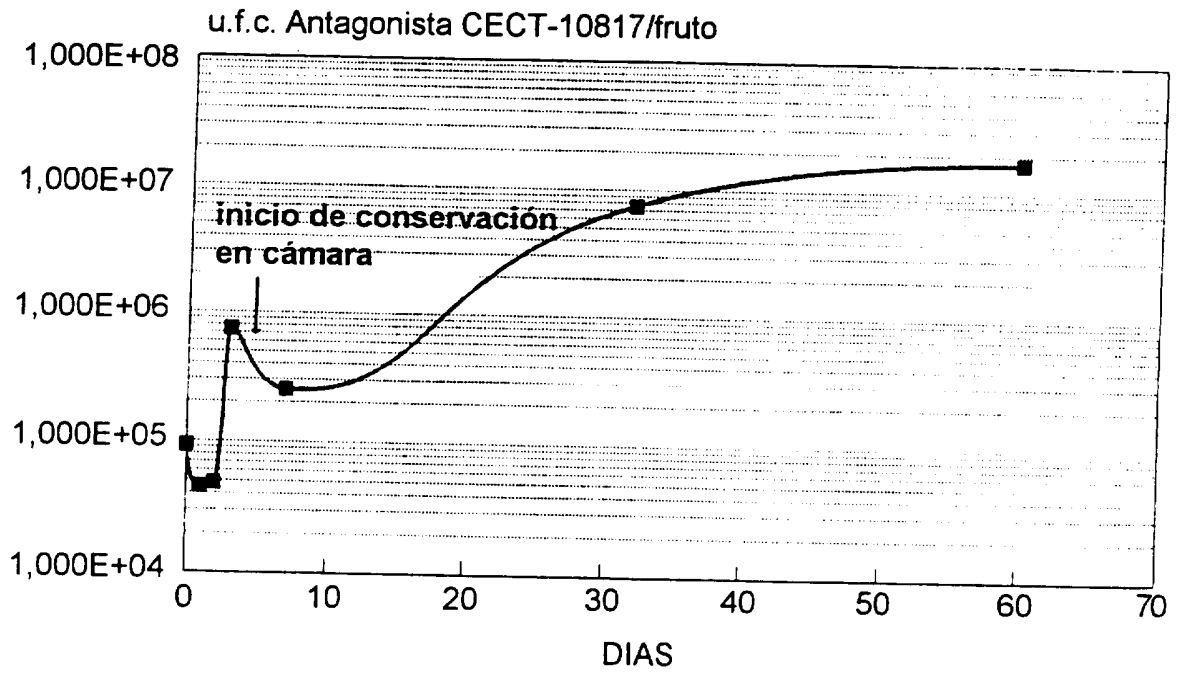


Fig. 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 96/00064

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶: C12N 1/16 A01N 63/04 A23B 7/155 // (C12N 1/16, C12R 1:72)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶: C12R A01N A23B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M.H.JLJALKI ET AL.: "Biological Control of Botrytis cinerea and Penicillium sp. on Post-Harvest Apples by Two Antagonistic Yeast" MEDEDELINGEN VAN DE FACULTEIT LANDBOUWWETENSCHAPPEN RIJKSUNIVERSITEIT GENT, Vol. 58, num. 3B, 1993 pages 1349-1359 see the whole document	1-12
X	C.L. WILSON ET AL.: "A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables" SCIENTIA HORTICULTURAE, Vol. 53, num. 3, 1993, AMSTERDAM, NL, pages 183-189 see the whole document	1-12
A	WO 9218009 A (DARATECH PTY LTD) 29 October 1992 (29.10.92) cited in the application see the whole document	1-12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 June 1996 (20.06.96)

Date of mailing of the international search report
28 June 1996 (28.06.96)

Name and mailing address of the ISA/
SPTO

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 96/00064

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9101641 A (US ARMY; STATE OF ISRAEL AS REPRESENTED (IL) 21 February 1991 (21.02.91) see the whole document Y US 5041384 A cited in the application	1-12
A	WO 9502964 A (US GOVERNMENT) 2 February 1995 (02.02.95) see the whole document	1-12
A	R.J.MCLAUGHLIN ET AL.: "Effect of Inoculum Concentration and Salt Solutions on Biological Control of Postharvest Diseases of Apple with Candida sp." PHYTOPATHOLOGY Vol. 80, num. 5, 1990 pages 456-461 cited in the applicatrion see the whole document	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Intern al Application No
PCT/ES 96/00064

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9218009 A	29.10.92	AU 658409 B US 5525132 A	13.04.95 11.06.96
WO 9101641 A	21.02.91	US 5413783 A US 5041384 A AU 652123 B AU 6071490 B CA 2064730 A EP 0485440 A KR 9502857 B NZ 234905 A	09.05.95 20.08.91 18.08.94 11.03.91 01.02.91 20.05.92 27.03.95 25.03.94
WO 9502964 A	02.02.95	AU 7407094 B CA 2167802 A EP 0712279 A	20.02.95 02.02.95 22.05.96

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES 96/00064

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP6 C12N 1/16 A01n 63/04 A23B 7/155 // (C12N 1/16, C12R 1:72)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP6 C12R A01N A23B

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de los pasajes relevantes	Nº de las reivindicaciones a que se refieren
X	M.H.JIJALKI ET AL.: "Biological Control of Botrytis cinerea and Penicillium sp. on Post-Harvest Apples by Two Antagonistic Yeast" MEDEDELINGEN VAN DE FACULTEIT LANDBOUWWETENSCHAPPEN RIJKSUNIVERSITEIT GENT, Vol. 58, num. 3B, 1993 páginas 1349-1359 Ver el documento completo	1-12
X	C.L. WILSON ET AL.: "A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables" SCIENTIA HORTICULTURAE, Vol. 53, num. 3, 1993, AMSTERDAM, NL, páginas 183-189 Ver el documento completo	1-12
A	WO 9218009 A (DARATECH PTY LTD) 29.10.92 citado en la solicitud Ver el documento completo	1-12

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familia de patentes se indican en anexo

- | | |
|--|---|
| <p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" documento anterior publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p> | <p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención</p> <p>"X" documento particularmente relevante: La invención reivindicada no puede considerarse nueva ni que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante: La invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p> |
|--|---|

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
20 JUNIO 1996 (20.06.96)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
28 JUNIO 1996 (28.06.96)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OEPM
C/ PANAMA, 1, 28071 MADRID - ESPAÑA
nº de fax 34 1 3495304

Funcionario autorizado
ANA POLO
nº de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 96/00064

C (Continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de los pasajes relevantes	Nº de las reivindicaciones a que se refieren
A	WO 9101641 A (US ARMY; STATE OF ISRAEL AS REPRESENTED (IL) 21.02.91 Ver el documento completo Y US 5041384 A Citado en la solicitud	1-12
A	WO 9502964 A (US GOVERNMENT) 02.02.95 Ver el documento completo	1-12
A	R.J.MCLAUGHLIN ET AL.: "Effect of Inoculum Concentration and Salt Solutions on Biological Control of Postharvest Diseases of Apple with Candida sp." PHYTOPATHOLOGY Vol. 80, num. 5, 1990 Páginas 456-461 citado en la solicitud Ver el documento completo	1-12

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
 Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 96/00064

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9218009 A	29.10.92	AU 658409 B	13.04.95
		US 5525132 A	11.06.96
WO 9101641 A	21.02.91	US 5413783 A	09.05.95
		US 5041384 A	20.08.91
		AU 652123 B	18.08.94
		AU 6071490 B	11.03.91
		CA 2064730 A	01.02.91
		EP 0485440 A	20.05.92
		KR 9502857 B	27.03.95
		NZ 234905 A	25.03.94
WO 9502964 A	02.02.95	AU 7407094 B	20.02.95
		CA 2167802 A	02.02.95
		EP 0712279 A	22.05.96