

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 395**

51 Int. Cl.:

C12N 1/16 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2017 PCT/IB2017/055453**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2018 WO18047123**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2017 E 17848253 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024 EP 3512934**

54 Título: **Control biológico de microorganismos fitopatógenos**

30 Prioridad:

12.09.2016 US 201662393641 P

13.09.2016 NZ 16724271

28.10.2016 NZ 16725641

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
22.04.2025

73 Titular/es:

**THE NEW ZEALAND INSTITUTE FOR PLANT AND
FOOD RESEARCH LIMITED (100.00%)
120 Mt Albert Road, Mt Albert
Auckland 1025, NZ**

72 Inventor/es:

**ELMER, PHILIP y
HOYTE, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 3 014 395 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

Control biológico de microorganismos fitopatógenos

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere en general a métodos de uso de levaduras para el control biológico de bacterias y hongos fitopatógenos. En particular, la invención se refiere a una cepa de levadura novedosa que tiene actividad de control biológico, y a métodos de uso de esta cepa para inhibir la supervivencia, el crecimiento y/o la proliferación de bacterias y hongos fitopatógenos en plantas de fruta u hortaliza.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades de las plantas representan un coste económico significativo para la agricultura moderna. Los sistemas actuales de agricultura a menudo requieren que se cultiven uno o unos pocos cultivos o tipos de plantas en un área grande. Tal sistema ecológicamente desequilibrado es susceptible a enfermedades.

Tradicionalmente, el control de patógenos de plantas que causan enfermedades, tales como bacterias y hongos, se ha llevado a cabo utilizando pesticidas químicos. Sin embargo, el uso de productos químicos está sujeto a una serie de desventajas. Los patógenos pueden y han desarrollado tolerancia a los productos químicos con el tiempo, produciendo poblaciones cada vez más resistentes a los pesticidas. Los residuos químicos también pueden plantear peligros ambientales, así como plantear problemas de salud. En particular, los consumidores se han preocupado cada vez más por los residuos químicos en las plantas y en los alimentos y el vino, y sus efectos sobre la salud humana y el medio ambiente.

El control biológico representa un medio alternativo para controlar las enfermedades de las plantas que reduce la dependencia de los productos químicos. Tales métodos "naturales" disfrutan de una mayor aceptación pública y pueden ser más efectivos y sostenibles que los métodos de control químico.

Pseudomonas es un género de gammaproteobacteria aeróbica gramnegativa, perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*. El género contiene 191 especies válidamente descritas, de las cuales varias son patógenos de plantas. Dentro del género *Pseudomonas* spp., *P. syringae* es un patógeno de planta prolífico que existe como más de 50 patovarietades (pv.) diferentes, muchas de las cuales demuestran un alto grado de especificidad de planta hospedadora. Numerosas otras especies de *Pseudomonas* también pueden actuar como patógenos de plantas, más notablemente todos los otros miembros del subgrupo *P. syringae*. Por ejemplo, enfermedades comercialmente importantes causadas por patovarietades de *P. syringae* incluyen la explosión bacteriana de las frutas de hueso, mota bacteriana del tomate y tizón en los guisantes.

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (Psa) es una enfermedad bacteriana grave que afecta al kiwi. Psa se registró por primera vez en Nueva Zelanda a principios de noviembre de 2010 y, a partir del 18 de julio de 2013, el 75 % de las hectáreas de kiwi estaban en huertos con alguna infección por Psa. El coste inmediato de la Psa para la industria del kiwi de Nueva Zelanda se estima entre 310 millones de dólares y 410 millones de dólares entre 2013 y 2018, y más del doble a largo plazo por la pérdida de desarrollo.

Al igual que con muchas enfermedades bacterianas de las plantas, las opciones de control son limitadas. Las principales soluciones actualmente en uso son la higiene de los cultivos, tratamiento a base de productos químicos, como productos a base de cobre, y/o inductores de defensa vegetal, como acibenzolar-S-metilo (Actigard/Bion, Syngenta) y antibióticos, como sulfato de estreptomina y kasugamicina. Sin embargo, se han impuesto severas restricciones sobre el uso de estos productos y el momento de la temporada de crecimiento en el que pueden usarse (por ejemplo, en Nueva Zelanda). Además, el uso de algunos de estos productos está prohibido en algunas regiones de exportación clave, por ejemplo, la estreptomina no está permitida para su uso en horticultura en Europa.

Se ha estimado que en la temporada de 2012 en Nueva Zelanda, se gastaron 13 millones de dólares en aerosoles para proteger los kiwis contra la Psa. Este es solo el coste de productos químicos. Otros costes de gestión no se han tenido en cuenta en esta estimación. Fuera de Nueva Zelanda, la Psa también es un problema crítico en Europa (Italia/Francia), América del Sur y potencialmente en China y Corea del Sur.

Botrytis cinerea y recientemente identificado *B. pseudocinerea* son hongos fitopatógenos (telemorfos *Botryotinia fuckeliana*) y son los agentes causales de la enfermedad del moho gris (tizón *Botrytis*). Algunas estimaciones de las pérdidas mundiales de cultivos resultantes de *Botrytis* spp. están en el orden de 10-100 mil millones de euros por año (<http://www.genoscope.cns.fr>). *Botrytis* spp. también es el agente causante de la pudrición del racimo de las uvas, y se estima que causa pérdidas de 18 millones de dólares por año solo en la industria del vino de Nueva Zelanda. El control de *Botrytis* spp. ha sido por medio de fungicidas. Al igual que con el uso de tratamientos químicos para controlar bacterias patógenas, esta práctica es insostenible porque la resistencia a los fungicidas está muy extendida en muchos viñedos y existe una presión de los consumidores para reducir los residuos de pesticidas.

La pudrición marrón en la fruta es causada por hongos *Monilinia* spp. *Monilinia* spp. son patógenos de muchos cultivos económicamente importantes de la familia de las rosáceas, incluidas las cerezas, ciruelas, melocotones, albaricoques, fresas, frambuesas, manzanas y peras. *Monilinia* spp. también son patógenos de muchas plantas con flores dentro de la familia *Ericaceae*. Los daños causados por *Monilinia* spp. a menudo pueden causar pérdidas importantes en los cultivos y en las valiosas flores ornamentales. El género *Monilinia* contiene aproximadamente treinta especies descritas.

De manera importante, los ingresos perdidos debido al impacto de los hongos fitopatógenos representan una mera fracción del impacto económico total de estos patógenos en todo el mundo. Al igual que con *Botrytis*, el control de *Monilinia* spp. y *Sclerotinia* spp. en cultivos económicamente importantes ha sido tradicionalmente por medio de fungicidas. Algunas estimaciones consideran que el coste del control químico de *Botrytis* spp. solo puede alcanzar 780 millones de dólares para un solo cultivo con enfermedad en las plantas tratadas que aún da como resultado una pérdida de producción significativa (Genescope, 2002); (Laluk, Kristin y Tesfaye Mengiste; 2010 en Arabidopsis Book 2010, Vol. 8).

Por consiguiente, por una serie de razones económicas, de salud y de sostenibilidad medioambiental, como se ha comentado anteriormente, el uso de tratamientos a base de productos químicos, inductores de defensa vegetal y antibióticos tiene limitaciones. Por lo tanto, existe una necesidad de nuevas soluciones de control biológico, que no tengan problemas de coste, salud o medioambiente similares a los tratamientos a base de productos químicos, con el fin de proporcionar un tratamiento sostenible de estas enfermedades.

Un objetivo de la invención es proporcionar al menos un agente de control biológico de levadura y/o una composición que comprende al menos un agente de control biológico de levadura y/o métodos de uso de dicho agente y/o dicha composición para controlar las bacterias *Pseudomonas* spp. en al menos una planta o parte de la misma, preferiblemente *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa); y/o al menos proporcionar al público una opción útil.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención se refiere a la cepa YBCA5 de levadura *Aureobasidium pullulans* aislada (n.º de acceso de CBS 141880).

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende la cepa YBCA5 de levadura *Aureobasidium pullulans* aislada (n.º de acceso de CBS 141880) y un vehículo agrícolamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que consiste esencialmente en la cepa YBCA5 de levadura *Aureobasidium pullulans* aislada (n.º de acceso de CBS 141880) y un vehículo agrícolamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de control de bacterias *Pseudomonas* spp. en una planta o parte de la misma, comprendiendo el método poner en contacto la planta o parte de la misma con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para controlar bacterias *Pseudomonas* spp. en una planta o parte de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere a YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para su uso, o cuando se usa, para controlar bacterias *Pseudomonas* spp. en una planta o parte de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para controlar *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa) en una planta de kiwi o parte de la misma, comprendiendo el método poner en contacto la planta de kiwi o parte de la misma con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para aumentar el rendimiento de una planta de kiwi infectada o susceptible de infección con Psa, comprendiendo el método aplicar YBCA5 o una composición que comprende YBCA5 a la planta de kiwi o parte de la misma, y hacer crecer la planta de kiwi o parte de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para controlar Psa en una planta de kiwi o parte de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para aumentar el rendimiento de una planta de kiwi infectada o susceptible de infección con Psa.

En otro aspecto, la invención se refiere a YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para su uso, o cuando se usa, para controlar la Psa en una planta de kiwi o parte de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere a YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para su uso, o cuando se usa, para aumentar el rendimiento de una planta de kiwi infectada o susceptible de infección con Psa.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de control de al menos un hongo fitopatógeno en una planta o parte de la misma, comprendiendo el método poner en contacto la planta o parte de la misma con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para aumentar el rendimiento de una planta de fruta u hortaliza infectada con, o susceptible de infección por un hongo fitopatógeno, comprendiendo el método aplicar YBCA5 o una composición que comprende YBCA5 a la planta de fruta u hortaliza o parte de la misma YBCA5, y hacer crecer la planta o parte de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para controlar un hongo fitopatógeno en una planta de fruta u hortaliza o parte de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para aumentar el rendimiento de una planta de fruta u hortaliza o parte de la misma infectada con, o susceptible de infección por un hongo fitopatógeno.

En otro aspecto, la invención se refiere a YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para su uso, o cuando se usa, para controlar al menos un hongo fitopatógeno en una planta o parte de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere a YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para su uso, o cuando se usa, para controlar al menos un hongo fitopatógeno en una planta de fruta u hortaliza o parte de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere a YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para su uso, o cuando se usa, para aumentar el rendimiento de una planta de fruta u hortaliza susceptible de infección por al menos un hongo fitopatógeno.

En otro aspecto, la invención se refiere a al menos una planta o parte de la misma tratada con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5.

En otro aspecto, la invención se refiere a al menos una planta de fruta u hortaliza o parte de la misma tratada con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5.

En otro aspecto, la invención se refiere a al menos una planta o parte de la misma tratada con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5. En algunas realizaciones, la planta es una planta de fruta u hortaliza o parte de la misma. En una realización, la planta es una planta de kiwi, un cerezo o una vid.

Realizaciones adicionales de los aspectos de la invención expuestos anteriormente se describen adicionalmente en la Descripción Detallada y se exponen en las reivindicaciones de la solicitud.

Se pretende que la referencia a un intervalo de números divulgados en el presente documento (por ejemplo, de 1 a 10) también incorpore la referencia a todos los números racionales dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1, 1,1, 2, 3, 3,9, 4, 5, 6, 6,5, 7, 8, 9 y 10) y también cualquier intervalo de números racionales dentro de ese intervalo (por ejemplo, de 2 a 8, de 1,5 a 5,5 y de 3,1 a 4,7) y, por lo tanto, todos los subintervalos de todos los intervalos expresamente divulgados en el presente documento se divulgan expresamente en el presente documento. Estos son solo ejemplos de lo que se pretende específicamente y todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerados deben considerarse expresamente indicadas en esta solicitud de manera similar.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora solo a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos en los que:

Figura 1. Gravedad de Psa (área media de necrosis foliar) en plántulas de "Hayward" en maceta tratadas con diferentes concentraciones de YBCA5 recién fermentada, en comparación con una formulación de gránulos solubles en agua (gránulo de YBCA5) e inoculados con dos dosis (5×10^6 por gota y 2×10^5 por gota de 10 ul) de Psa. Se usaron tres gotas de 10 ul de cada dosis de Psa por lado de la hoja. Los tratamientos se aplicaron ocho y un día (1d) antes de la inoculación con Psa el 18 de septiembre de 2014 y se evaluaron después de 28 días.

Figura 2. El efecto de diferentes aislados de *Aureobasidium pullulans* sobre la gravedad de las lesiones de la mancha foliar de Psa en plantas de kiwi en maceta ("Hayward") en comparación con las no tratadas (Nil) en abril de 2016.

Figura 3. Incidencia de hojas con necrosis de Psa en plantas "Hayward" en macetas expuestas a inóculo de Psa natural en el huerto de investigación Te Puke y con tratamiento aplicado en cuatro ocasiones durante un período de 30 días. La evaluación de la necrosis foliar se llevó a cabo 44 días después de la primera aplicación de tratamiento.

Figura 4. Pruebas de campo de la eficacia de YBCA5. Nil es la incidencia observada de manchas foliares en plantas de control no tratadas. Estándar de cultivador es la incidencia observada de manchas foliares de Psa en plantas tratadas con Actigard y cobre. Baja y alta se refieren a la cantidad de YBCA4 e YBCA5 respectivamente que se aplicó a las plantas. El sitio de campo fue Maketu. La variedad de kiwi era "Hayward". Todos los tratamientos se aplicaron entre la brotación y la prefloración. Se llevaron a cabo un total de 5 tratamientos por pulverización con una diferencia de entre 6 y 12 días. Para cada una de las figuras 4-8, la tasa alta es 2×10^7 células/ml y la tasa baja es 1×10^7 .

Figura 5. Pruebas de campo de la eficacia de YBCA5. Nil es la incidencia observada de defectos en las plantas de control no tratadas. Estándar de cultivador es la incidencia observada de manchas foliares de Psa en plantas tratadas con Actigard y cobre. Baja y alta se refieren a la cantidad de YBCA4 e YBCA5 respectivamente que se aplicó a las plantas. El sitio de campo fue Maketu. La variedad de kiwi era "Hayward". Todos los tratamientos se aplicaron entre la brotación y la prefloración. Se llevaron a cabo un total de 5 tratamientos por pulverización con una diferencia de entre 6 y 12 días.

Figura 6. Pruebas de campo de la eficacia de YBCA5 que muestran la gravedad media de la necrosis foliar. La variedad de kiwi era "Hayward". Estándar de cultivador es cobre + antibiótico. Los tratamientos se aplicaron desde la brotación hasta la primera floración en dos sitios en Maketu. Se aplicaron 6 tratamientos (pulverizaciones) en total, cada 7-14 días.

Figura 7. Pruebas de campo de la eficacia de YBCA5 que muestran la gravedad media del pardeamiento de las yemas. La variedad de kiwi era "Hayward". Estándar de cultivador es cobre + antibiótico. Los tratamientos se aplicaron desde la brotación hasta la primera floración en dos sitios en Maketu. Se aplicaron 6 tratamientos (pulverizaciones) en total, cada 7-14 días.

Figura 8. Pruebas de campo de la eficacia de YBCA5 que muestran el aumento medio del rendimiento (peso fresco/materia seca/fruto/m²). La variedad de kiwi era "Hayward". Estándar de cultivador es cobre + antibiótico. Los tratamientos se aplicaron desde la brotación hasta la primera floración, una vez durante la floración y una vez después del cuajado. Se aplicaron 7 tratamientos (pulverizaciones) en total, cada 7-14 días. En cada categoría: peso fresco, materia seca, fruto/m² (Gold3) y fruto/m² ("Hayward") las barras en el gráfico de izquierda a derecha representan un tratamiento Nil, tratamiento estándar de cultivador (cobre y antibiótico) y YBCA5.

Figura 9. El efecto de YBCA5 sobre la incidencia de podredumbre de fruta por *Monilinia* de cerezas ("Sweet Valentine") en comparación con el fungicida iprodiona (Rovral® Aquaflo) en un ensayo de laboratorio (Ensayo 1) en enero-febrero de 2016.

Figura 10. El efecto de YBCA5 sobre la incidencia de podredumbre de fruta por *Botrytis* spp. de cerezas ("Sweet Valentine") en comparación con el fungicida iprodiona en un ensayo de laboratorio (Ensayo 2) en enero-febrero de 2016.

Figura 11. El efecto de YBCA5 sobre la incidencia de podredumbre de fruta por *Monilinia* de cerezas ("Sweet Valentine") en comparación con el fungicida captan en un ensayo de laboratorio (Ensayo 3) en febrero-marzo de 2016.

Figura 12. El efecto de YBCA5 sobre la incidencia de podredumbre de fruta por *Botrytis* spp. de cerezas ("Sweet Valentine") en comparación con el fungicida captan en un ensayo de laboratorio (Ensayo 2) en febrero-marzo de 2016.

Figura 13. El efecto de YBCA5 sobre la gravedad de podredumbre por *Botrytis* spp. de las uvas de mesa ("Autumn King") en comparación con el fungicida captan en un ensayo de laboratorio (Ensayo 5) en octubre-noviembre de 2015. Los datos son la media de dos aislados de *Botrytis* spp.

Figura 14. El efecto de YBCA5 en la gravedad de la podredumbre del kiwi debido a la infección por hongos fitopatógenos después de la cosecha. Tamaño de la lesión (mm) de kiwi "Hongyang" con heridas después de la inoculación con *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., *Penicillium* spp. o *Phomopsis* spp. y 6 días de incubación. LSD (5 %) = 3,482, P fr = <.001.

Figura 15. El efecto de YBCA5 en la gravedad de la podredumbre del kiwi debido a la infección por hongos fitopatógenos después de la cosecha. Tamaño de la lesión (mm) de kiwi "Hongyang" con heridas después de la inoculación con *Cryptosporiopsis* spp. y 7 días de incubación. LSD (5 %) = 1,945, P fr = <.001.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Las siguientes definiciones se presentan para definir mejor la presente invención y como guía para aquellos expertos en la materia en la práctica de la presente invención.

A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento deben entenderse que tienen el mismo significado que le atribuye un experto en la materia relevante a la que se refiere esta divulgación.

Ejemplos de definiciones de términos comunes en botánica, microbiología, biología molecular y bioquímica se pueden encontrar en Biology of Plants, Raven *et al.* (eds.), W.H. Freeman and Company, (2005); Plant Physiology, Taiz *et al.* (eds.), Sinauer Associates, Incorporated, (2010); Botany: An Introduction to Plant Biology, J.D. Mauseth, Jones & Bartlett Learning, (2003); Methods for General and Molecular Microbiology, 3.^a Edición, C. A. Reddy, *et al.* (eds.), ASM Press, (2008); Encyclopedia of Microbiology, 2^a ed., Joshua Lederburg, (ed.), Academic Press, (2000); Microbiology By Cliffs Notes, I. Edward Alcamo, Wiley, (1996); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Singleton *et al.* (2^a ed.) (1994); Biology of Microorganisms 11^a ed., Brock *et al.*, Pearson Prentice Hall, (2006); Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods, Mueller *et al.*, Academic Press, (2004); Genes IX, Benjamin Lewin, Jones & Bartlett Publishing, (2007); The Encyclopedia of Molecular Biology, Kendrew *et al.* (eds.), Blackwell Science Ltd., (1994); y Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, Robert A. Meyers (ed.), VCH Publishers, Inc., (1995).

También se cree que la práctica de la presente invención puede realizarse utilizando protocolos y procedimientos estándar de botánica, microbiología, biología molecular y bioquímica conocidos en la técnica, y tal como se describe, por ejemplo en Environmental Microbiology: Methods and Protocols, J. F. T. Spencer *et al.*, Humana Press, (2004); Environmental Microbiology, P. D. Sharma, Alpha Science International, (2005); Environmental Microbiology, J.R. Leadbetter, Gulf Professional Publishing, (2005) y otros materiales de referencia comúnmente disponibles relevantes en la técnica a la que pertenece esta divulgación.

El término "planta", como se usa en el presente documento, abarca plantas enteras y todas las partes de una planta de todas las etapas de un ciclo de vida de la planta, incluidas, entre otras, células y tejidos vegetativos y reproductivos, propágulos, semillas, embriones, frutos, brotes, tallos, hojas, vainas y láminas foliares, inflorescencias, raíces, anteras, lígulas, palisade, mesófilo, epidermis, aurículas, palea, lema y macollos.

El término "kiwi" se usa en el presente documento como el nombre común para todas las frutas cultivadas comercialmente del género Actinidia. El kiwi más común es el kiwi de pulpa verde, de la especie *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*. Otras especies que se comen comúnmente incluyen el kiwi dorado (*A. Chinensis* var. *chinensis*), grosella espinosa china (*A. coriacea*), kiwi bebé (*A. Arguta*), kiwi ártico (*A. kolomikta*), kiwi rojo (*A. melanandra*; *A. chinensis* var. *Chinensis*), planta de plata (*A. polygama*) y kiwi morado (*A. purpurea*).

El término "agente de control biológico" como se usa en el presente documento se refiere a agentes que actúan como antagonistas de uno o más patógenos de plantas. Los antagonistas pueden adoptar diversas formas. En una forma, el agente de control biológico puede competir con el patógeno por los nutrientes disponibles y/o el espacio de la planta hospedadora. En otra forma, el agente de control biológico puede hacer que el entorno sea desfavorable para el patógeno. Por consiguiente, los mecanismos antagonistas incluyen, sin limitarse a, antibiosis, micoparasitismo, competencia de nutrientes y desplazamiento físico.

Los términos "control", "que controla", "biocontrol" o "control biológico" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a la reducción de la cantidad de inóculo o actividad productora de enfermedad de un patógeno lograda por o a través de uno o más microorganismos. En general, se comprende la prevención o reducción de la infección por bacterias u hongos fitopatógenos, particularmente *Pseudomonas* spp., *Botrytis* spp., *Alternaria* spp., *Colletotrichum* spp., *Penicillium* spp., *Phomopsis* spp., *Cryptosporiopsis* spp., *Monilinia* spp. y *Sclerotinia* spp. fitopatógenos, particularmente o la inhibición de la tasa o extensión de dicha infección, incluyendo cualquier reducción de la supervivencia, crecimiento y/o proliferación de las bacterias u hongos. También se contempla el tratamiento curativo.

El término "estadísticamente significativo" como se usa en el presente documento se refiere a la probabilidad de que un resultado o relación sea causado por algo distinto de la casualidad aleatoria. Se puede encontrar que un resultado es estadísticamente significativo usando pruebas de hipótesis estadísticas como se conoce y se usa en la técnica. Las pruebas de hipótesis estadística proporcionan un "valor P" como se conoce en la técnica, que representa la probabilidad de que el resultado medido se deba únicamente al azar. Se cree que generalmente se acepta en la técnica que los niveles de significancia del 5 % (0,05) o inferiores se consideran estadísticamente significativos.

El término "cantidad eficaz" como se usa en el presente documento significa una cantidad eficaz para proteger contra, retrasar, reducir, estabilizar, mejorar o tratar la infección bacteriana o fúngica patógena de plantas en y/o sobre una planta.

Las expresiones "aumentar el rendimiento de una planta de fruta u hortaliza" y "aumentar el rendimiento de una planta de kiwi" como se usan en el presente documento generalmente comprenden aumentar la tasa de producción de fruta

y/o kiwi cosechable, el número total de frutos y/o kiwis cosechables (incluido debido al aumento absoluto en el número de frutos y/o kiwis o la reducción de los síntomas de la enfermedad que conduce a un mayor número de frutos vendibles), y cualquier aumento en el tamaño de los frutos individuales y/o kiwis producidos en una planta de fruta u hortaliza o planta de kiwi tratada de acuerdo con la invención. El aumento se determina generalmente en comparación con una planta equivalente que no se ha tratado con la cepa o la composición de la invención.

Un "adyuvante agrícolamente aceptable" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o material que generalmente se comprende en la técnica de la agricultura como un aditivo útil en formulaciones agrícolas o se lleva a cabo con tratamientos agrícolas.

Un "agente activo adicional" como se usa en el presente documento significa cualquier compuesto o material que sea capaz de contribuir al control (como se define en el presente documento) de bacterias *Pseudomonas* spp. fitopatógenas u hongos fitopatógenos *Botrytis* spp., *Alternaria* spp., *Colletotrichum* spp., *Penicillium* spp., *Phomopsis* spp., *Cryptosporiopsis* spp., *Monilinia* spp., and *Sclerotinia* spp. por las levaduras útiles en la presente invención, o que es capaz de potenciar los efectos de las levaduras útiles en esta invención para controlar enfermedades de las plantas causadas por bacterias y hongos fitopatógenos.

Un "agente de formulación", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto o material que facilite u optimice la producción, manipulación, almacenamiento, transporte, aplicación y/o persistencia de la composición de, o para su uso en la invención en plantas (como se define en el presente documento), pero sin limitarse a los mismos.

En el presente documento se usa un "vehículo agrícolamente aceptable" como se comprende generalmente en la técnica. Un vehículo agrícolamente aceptable preferido es agua, pero sin limitarse a la misma.

El término "que comprende" como se usa en esta memoria descriptiva significa "que consiste al menos en parte en". Al interpretar cada declaración en esta memoria descriptiva que incluye el término "que comprende", también pueden estar presentes características distintas de las precedidas por el término. Los términos relacionados tales como "comprenden" y "comprende" deben interpretarse de la misma manera.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en general a una cepa YBCA5 de levadura *Aureobasidium pullulans* novedosa y a las composiciones que comprenden YBCA5 y un vehículo agrícolamente aceptable. En algunas realizaciones, las composiciones también comprenden un adyuvante agrícolamente aceptable. La cepa novedosa y las composiciones de la invención son útiles para el control biológico de enfermedades de las plantas causadas por bacterias fitopatógenas y hongos fitopatógenos, particularmente bacterias *Pseudomonas* spp. y hongos *Botrytis* spp., *Sclerotinia* spp., *Alternaria* spp., *Colletotrichum* spp., *Penicillium* spp., *Phomopsis* spp., *Cryptosporiopsis* spp. y *Monilinia* spp. La invención también se refiere a métodos de control de bacterias y/u hongos fitopatógenos seleccionados del grupo que consiste en bacterias *Pseudomonas* spp., hongos *Botrytis* spp., *Sclerotinia* spp., *Penicillium* spp., *Colletotrichum* spp., *Alternaria* spp., *Phomopsis* spp., *Cryptosporiopsis* spp. y *Monilinia* spp. en una planta o parte de la misma poniendo en contacto la planta o parte de la misma con YBCA5.

Los solicitantes son los primeros en proporcionar la cepa de levadura aislada YBCA5 y las composiciones que comprenden YBCA5 y un vehículo agrícolamente aceptable que son eficaces para controlar bacterias *Pseudomonas* spp. y hongos fitopatógenos en las plantas. En algunas realizaciones, YBCA5 o la composición que comprende YBCA5 también se puede formular con un adyuvante agrícolamente aceptable. Los solicitantes también son los primeros en proporcionar métodos de uso de la levadura, *A. pullulans* para el control biológico de bacterias *Pseudomonas* spp. En particular, los solicitantes son los primeros en demostrar que una cepa de levadura *A. pullulans*, o una composición que comprende una cepa de levadura *A. pullulans* es eficaz para inhibir la supervivencia, el crecimiento y/o la proliferación de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) en plantas de fruta u hortaliza, particularmente plantas de fruta u hortaliza, particularmente plantas de kiwi.

Sin desear estar unido por la teoría, los solicitantes creen que la eficacia de la cepa de levadura y las composiciones de la invención se refiere a la capacidad de la cepa de levadura para excluir competitivamente Psa y/u hongos fitopatógenos, por excreción de un compuesto o compuestos antimicrobianos, o por provocación de mecanismos de defensa de plantas, o una combinación de los anteriores. Independientemente del modo de acción concreto, los inventores han descubierto sorprendentemente que YBCA5 es eficaz para tratar la enfermedad por Psa en las plantas de kiwi, para tratar infección por *Botrytis* spp. y *Monilinia* spp. en cerezas y uvas, y para tratar *Alternaria* spp., *Colletotrichum* spp., *Penicillium* spp., *Phomopsis* spp., *Cryptosporiopsis* spp, en manzanas y kiwis.

YBCA5 es un agente de control biológico particularmente eficaz contra bacterias *Pseudomonas* spp. y hongos fitopatógenos. YBCA5 demuestra la capacidad de sobrevivir a los protocolos de formulación y aplicación, colonizar rápidamente las plantas tratadas y suprimir el crecimiento de bacterias *Pseudomonas* spp. y de hongos fitopatógenos en plantas y partes de las mismas tratadas. Se ha descubierto que YBCA5 es particularmente eficaz para controlar bacterias *P. syringae*, particularmente bacterias *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa), en plantas de kiwi, y para reducir y/o controlar, en diversos grados, la podredumbre de fruta después de la cosecha debido a *Botrytis* spp., *Sclerotinia* spp.,

Penicillium spp., *Colletotrichum* spp., *Alternaria* spp., *Phomopsis* spp., *Cryptosporiopsis* spp y *Monilinia* spp.

YBCA5 Y COMPOSICIONES

- 5 Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a la cepa YBCA5 de levadura *Aureobasidium pullulans* aislada (n.º de acceso de CBS 141880).

La cepa YBCA5 de *A. pullulans* aislada particular de la invención se depositó el 26 de septiembre de 2016 con el fin de un procedimiento de patente en virtud del Tratado de Budapest en Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS),
10 Uppsalalaan 8, 3584, CT Utrecht, Países Bajos. A este aislado se le ha otorgado el número de depósito n.º de acceso de CBS 141880.

La cepa YBCA5 de levadura *A. pullulans* aislada es un hongo unicelular del orden *Dothideales*, familia *Aureobasidiaceae* y género *Aureobasidium*. Las células muestran una amplia gama de variabilidad morfológica. *A. pullulans* cultivada en agar de dextrosa de patata produce colonias lisas, de color rosa pálido, similares a las de levadura. Las colonias más antiguas pueden ser algo más oscuras debido a la producción de clamidosporas. Los conidios primarios de *A. pullulans* son unicelulares, hialinos, lisos, elipsoidales y de forma y tamaño variables. Los conidióforos de *A. pullulans* son indiferenciados, intercalares o terminales, o surgen como ramas laterales cortas. Los endoconidios son producidos por células intercalares *A. pullulans*. Las hifas son de paredes delgadas, hialinas y lisas,
20 con septos transversales. El crecimiento se produce a 10-35 °C, siendo el crecimiento óptimo a 22-25 °C.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende YBCA5 (n.º de acceso de CBS 141880) y un vehículo agrícolamente aceptable.

- 25 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que consiste esencialmente en YBCA5 (n.º de acceso de CBS 141880) y un vehículo agrícolamente aceptable.

En una realización, el vehículo agrícolamente aceptable es agua.

- 30 De nuevo, sin el deseo de limitarse a teoría alguna, los inventores creen que cuando se usa como agente de control biológico, YBCA5 debe estar en una forma reproductivamente viable. Para la mayoría de los fines, YBCA5 se incorpora deseablemente en una composición en forma de células reproductivamente viables. Preferiblemente, YBCA5 se incorpora en la composición como células secadas.

- 35 La concentración de células en una composición de la invención dependerá de la utilidad a la que se destina la composición. Se cree que la optimización de la concentración de células para una aplicación particular está dentro de la experiencia en la técnica.

En algunas realizaciones, la concentración de células viables de YBCA5 en una composición de la invención varía de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{14} , preferiblemente de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^{11} , preferiblemente de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^9 , preferiblemente de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 , preferiblemente de aproximadamente 2×10^7 a aproximadamente 2×10^8 UFC, preferiblemente de aproximadamente 2×10^9 a aproximadamente 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 UFC por mililitro para composiciones líquidas.
45

En algunas realizaciones, la concentración de células viables de YBCA5 en una composición de la invención varía de 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{14} , preferiblemente de 1×10^5 a aproximadamente 1×10^{11} , preferiblemente de 1×10^6 a aproximadamente 1×10^9 , preferiblemente de 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 , preferiblemente de 2×10^7 a aproximadamente 2×10^8 UFC, preferiblemente de 2×10^9 a aproximadamente 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y de 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 UFC por mililitro para composiciones líquidas.
50

En algunas realizaciones, la concentración de células viables de YBCA5 en una composición de la invención varía de aproximadamente 1×10^3 a 1×10^{14} , preferiblemente de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^{11} , preferiblemente de aproximadamente 1×10^6 a 1×10^9 , preferiblemente de aproximadamente 1×10^7 a 1×10^8 , preferiblemente de aproximadamente 2×10^7 a 2×10^8 UFC, preferiblemente de aproximadamente 2×10^9 a 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y de aproximadamente 1×10^7 a 1×10^8 UFC por mililitro para composiciones líquidas.
55

En algunas realizaciones, la concentración de células viables de YBCA5 en una composición de la invención varía de 1×10^3 a 1×10^{14} , preferiblemente de 1×10^5 a 1×10^{11} , preferiblemente de 1×10^6 a 1×10^9 , preferiblemente de 1×10^7 a 1×10^8 , preferiblemente de 2×10^7 a 2×10^8 UFC, preferiblemente de 2×10^9 a 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y de 1×10^7 a 1×10^8 UFC por mililitro para composiciones líquidas.
60

En algunas realizaciones, la concentración de células viables de YBCA5 en una composición de la invención es de aproximadamente 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y aproximadamente 2×10^7 UFC por mililitro para composiciones líquidas.
65

En algunas realizaciones, la concentración de células viables de YBCA5 en una composición de la invención es de al menos 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y al menos 2×10^7 UFC por mililitro para composiciones líquidas, preferiblemente la concentración de células viables de YBCA5 en una composición de la invención es de 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y 2×10^7 UFC por mililitro para composiciones líquidas.

La composición de la invención puede comprender o consistir esencialmente en YBCA5.

Las concentraciones de YBCA5 que son eficaces como agente de control biológico en la composición de la invención pueden variar dependiendo de la forma en la que se use la levadura, condición fisiológica de la planta; tipo, concentración y grado de infección por patógenos; temperatura; temporada; humedad; tipo de suelo; fase en la temporada de crecimiento; edad de la planta; número y tipo de pesticidas y fungicidas convencionales que se aplican y tratamientos de plantas (tales como poda, pero sin limitación a los mismos). Todos los factores pueden tenerse en cuenta al formular YBCA5 en la composición de la invención o en una composición para su uso en un método de la invención.

YBCA5 puede prepararse para su uso en la invención usando técnicas de fermentación líquida convencionales conocidas en la técnica y como se describe en los ejemplos en el presente documento. El crecimiento se efectúa comúnmente en condiciones aeróbicas en un biorreactor a temperaturas y pH adecuados para el crecimiento. Las temperaturas de crecimiento típicas son de 10 a 30 °C, preferiblemente de 15 a 28 °C, preferiblemente 25 °C. Las levaduras con temperaturas de crecimiento óptimas en el intervalo de aproximadamente 36-38 °C no son preferidas para su uso debido al riesgo potencial para la salud humana. El pH del medio de crecimiento suele ser ligeramente ácido a neutro a un pH de 4,0 a 7,0, preferiblemente 6,0.

El medio de crecimiento puede ser cualquier medio conocido de la técnica adecuado para el cultivo de especies *Aureobasidium*. En una realización, el medio de crecimiento es agarosa de dextrosa de patata (PDA). Otros medios de crecimiento adecuados incluyen agar de extracto de levadura de malta; un medio de cultivo de caldo líquido patentado que comprende melaza y urea; y un medio de crecimiento líquido patentado que comprende azúcar, urea, extracto de levadura y fosfato de monoamonio (MAP).

Las células de YBCA5 pueden recogerse usando técnicas convencionales de filtrado o sedimentación, tales como centrifugación, o pueden recolectarse en seco usando centrifugación continua. Las células pueden usarse inmediatamente o almacenarse en condiciones refrigeradas (de 1 °C a 7 °C, preferiblemente 2 °C), o pueden secarse. Preferiblemente, las células se secan y se formulan como gránulos de levadura seca. Por ejemplo, las células pueden secarse utilizando un secador de lecho fluidizado, pero sin limitarse al mismo. Preferiblemente, los gránulos de levadura seca comprenden al menos un 90 % de sólidos, preferiblemente al menos un 95 % de sólidos, preferiblemente de manera aproximada un 96 % de sólidos. Preferiblemente, las células tienen una vida útil de al menos dos años. En una realización, la vida útil es de al menos seis meses, preferiblemente al menos un año, preferiblemente al menos dos años, en donde las células se mantienen en condiciones refrigeradas. Preferiblemente, las condiciones refrigeradas son 10 °C o menos, pero mayor de 0 °C. Preferiblemente, las condiciones refrigeradas se seleccionan del grupo que consiste en 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C y 10 °C o variaciones dentro de tales temperaturas de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C.

En una realización, la composición comprende un adyuvante agrícolamente aceptable. En una realización, el adyuvante agrícolamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en un agente activo adicional y un agente de formulación.

En una realización, el adyuvante agrícolamente aceptable es uno o más agentes activos adicionales. En una realización, el adyuvante agrícolamente aceptable es uno o más agentes de formulación.

En una realización, la composición comprende una combinación de uno o más agentes activos adicionales y uno o más agentes de formulación. En algunas realizaciones, la composición se formula como una composición preparada previamente o en forma concentrada. En algunas realizaciones, la composición comprende una formulación sólida o una formulación líquida.

En una realización, la composición de la invención comprende uno o más adyuvantes agrícolamente aceptables. En una realización, los adyuvantes agrícolamente aceptables se seleccionan del grupo de agentes activos adicionales y agentes de formulación. Preferiblemente, el uno o más adyuvantes agrícolamente aceptables es un agente activo adicional. Preferiblemente, el uno o más adyuvantes agrícolamente aceptables es un agente de formulación.

En una realización, la composición de la invención comprende una combinación de uno o más agentes activos adicionales y uno o más agentes de formulación.

En algunos casos, también puede ser deseable incluir uno o más agentes activos adicionales en las composiciones de la invención donde dichos agentes activos adicionales son capaces de contribuir al control (por ejemplo, tratamiento y/o prevención) de bacterias *Pseudomonas* spp. fitopatógenas u hongos fitopatógenos que incluyen *Botrytis* spp.,

Sclerotinia spp., *Penicillium* spp., *Colletotrichum* spp., *Alternaria* spp., *Phomopsis* spp., *Cryptosporiopsis* spp. y *Monilinia* spp., pero sin limitarse a los mismos.

Los agentes activos adicionales adecuados para su uso en la presente invención pueden ser capaces de controlar *Pseudomonas* spp., particularmente *Psa* directamente, u hongos fitopatógenos que incluyen *Botrytis* spp., *Sclerotinia* spp., *Penicillium* spp., *Colletotrichum* spp., *Alternaria* spp., *Phomopsis* spp., *Cryptosporiopsis* spp. y *Monilinia* spp., (pero sin limitarse a los mismos), o pueden ser capaces de potenciar el efecto de control biológico de YBCA5 para controlar *Pseudomonas* spp., particularmente *Psa*. Los agentes activos adicionales pueden incluirse directamente en la composición de o pueden ser útiles en la invención, o pueden aplicarse por separado, ya sea simultáneamente o secuencialmente según sea apropiado de acuerdo con un método de la invención.

Los agentes activos adicionales adecuados incluyen, pero no se limitan a inductores de defensa de plantas que incluyen acibenzolar-S-metilo (Actigard/Bion, Syngenta), ácido azelaico, ácido pipicolínico, ácido jasmónico, mezcla de algas, aceite de lema, revestimiento alimentario (DOMCA), Fungicover (bioDURACAL agricultura) e ibuprofeno, microorganismos antagonistas, sales inorgánicas que incluyen sales de calcio, potasio o sodio, agentes estimulantes que incluyen ácidos urónicos, mananos y β 1-3 glucanos, antibióticos y otros compuestos antibacterianos y antifúngicos que incluyen pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas.

A modo de ejemplo no limitativo, un agente activo adicional que puede incluirse en la composición de o para su uso en la invención es el inductor de defensa de plantas acibenzolar-S-metilo (Actigard/Bion, Syngenta). Actigard es un activador de plantas con un modo de acción único que estimula la respuesta de resistencia adquirida sistémica natural que se encuentra en la mayoría de las especies de plantas. Aplicado mediante aplicación foliar, Actigard no tiene actividad directa contra los patógenos objetivo, pero ayuda a reducir los síntomas de *Psa* en kiwi al inducir la resistencia de la planta hospedadora. Actigard es una composición que comprende 500 g/kg de acibenzolar-S-metilo en forma de gránulo dispersable en agua.

En una realización, la composición de la invención comprende uno o más agentes de formulación.

En una realización, la composición de la invención comprende una combinación de uno o más agentes activos adicionales y uno o más agentes de formulación.

En una realización, la composición de la invención se formula como una formulación sólida o líquida.

En una realización, la composición de la invención puede comprender uno o más agentes de formulación sólidos o líquidos. Puede usarse cualquier agente de formulación adecuado como se conoce en la técnica. Se cree que la selección de un agente de formulación adecuado está dentro de la experiencia de los expertos en la materia. Por ejemplo, un agente de formulación adecuado puede ser un compuesto u otro material que facilite u optimice la producción, manipulación, almacenamiento, transporte, aplicación y/o persistencia de la composición de, o para su uso en la invención en plantas o en partes de las mismas, pero sin limitarse a esto.

Los agentes de formulación pueden adaptarse específicamente para usos particulares tales como, pero sin limitación, la conservación y el mantenimiento de la actividad de control biológico de las levaduras comprendidas en la composición de o para su uso en la invención durante el transporte desde las instalaciones de producción, almacenamiento en el sitio, o durante la preparación de una mezcla de tratamiento final. Los agentes de formulación también se pueden usar para otros fines, como facilitar la adhesión y la persistencia en las plantas o la penetración en los tejidos de las plantas, pero sin limitarse a los mismos. Una formulación adecuada puede ser sólida, líquida, sola o en combinación. Los agentes de formulación particularmente adecuados incluyen tensioactivos, dispersantes, conservantes, agentes humectantes, emulsionantes, humectantes, adhesivos, esparcadores, estabilizantes, penetrantes, agentes de adhesión, tampones de pH y nutrientes, ya sea solos o en diversas combinaciones, según lo determine el experto en la materia.

La composición de la invención puede proporcionarse como una composición preparada previamente lista para su uso, o en una forma concentrada, sólida o líquida.

En una realización, la composición es una composición preparada previamente que tiene una formulación sólida o líquida. En una realización, la composición preparada previamente es una formulación sólida seleccionada de polvos, microgránulos, gránulos y perlas. En una realización, la composición preparada previamente es una formulación líquida.

La composición de o para su uso en la invención puede proporcionarse en una forma preparada previamente o en una forma concentrada. Si se proporciona en una forma seca, la composición preparada previamente puede proporcionarse como polvo, gránulo, microgránulo o perla, pero sin limitarse a los mismos. En el caso de una forma seca, YBCA5 en la composición está preferiblemente en forma deshidratada, secada y/o encapsulada. En algunas realizaciones, las formas deshidratadas, secadas y/o encapsuladas incluyen agentes protectores adicionales como se conoce en la técnica; por ejemplo, lioprotectores y similares.

En una realización, YBCA5 puede proporcionarse en forma de gránulo. Por ejemplo, YBCA5 puede proporcionarse en un gránulo que tiene al menos $0,5 \times 10^{10}$ UFC/g, preferiblemente 1×10^{10} UFC/g, preferiblemente 2×10^{10} UFC/g. Cuando la composición preparada previamente se proporciona en forma líquida, particularmente una forma acuosa, la composición puede proporcionarse como una dispersión, una suspensión, una mezcla, una crema, una pasta o un gel, pero sin limitarse a los mismos. Preferiblemente, la forma preparada previamente se proporciona como una forma líquida acuosa que es adecuada y/o está adaptada para pulverización. En una realización, se puede usar una forma líquida preparada previamente *per se* por ejemplo, como un baño para inocular frutos, hortalizas, semillas o plantas, incluyendo esquejes de plantas.

En la composición preparada previamente de la invención, YBCA5 se formula para su uso en plantas, particularmente plantas de kiwi. Por ejemplo, las levaduras se mezclan con un líquido portador agrícolamente aceptable que permite aplicaciones de pulverización, un fertilizante, un elicitor, un adyuvante, un agente humectante o cualquier otro agente adicional adecuado según sea necesario. En la composición preparada previamente para su uso de acuerdo con los métodos de la invención, YBCA5 también se puede mezclar con un líquido portador agrícolamente aceptable que permite aplicaciones de pulverización, un fertilizante, un elicitor, un adyuvante, un agente humectante o cualquier otro agente adicional adecuado según sea necesario.

Se cree que la formulación de YBCA5 en una composición preparada previamente de la invención y la forma final de la composición preparada previamente para su aplicación a la planta o parte de la misma están dentro del conocimiento de la técnica. Por ejemplo, la forma final de la composición se formula con un vehículo agrícolamente aceptable, tal como agua, para formar una pulverización, espuma, líquido de empapado, líquido inyectable, gel, baño o pasta, pero sin limitarse a los mismos. En una realización, una composición de la invención se puede aplicar a plantas o partes de las mismas mediante pulverización, inmersión, frotamiento o cepillado, o una combinación de los mismos. Preferiblemente, la composición se formula como una suspensión o dispersión acuosa para aplicación por pulverización o nebulización a las plantas de kiwi, cerezos y/o plantas de fruta y uva y/o frutas y/u hortalizas.

En una realización, la composición de la invención está en forma concentrada. En una realización, la forma concentrada es una forma sólida seleccionada de tortas, polvos, gránulos, microgránulos y perlas. En una realización, la forma concentrada es una formulación líquida.

Cuando la composición de la invención se proporciona en forma concentrada, puede requerir una formulación adicional por parte del usuario para producir una composición lista para su aplicación a una planta o parte de la misma. Por ejemplo, la forma concentrada se puede mezclar con diversos agentes de formulación para formar una composición final para su aplicación en plantas. Un agente de formulación preferido es agua o una solución acuosa en la que se disuelve una cantidad apropiada del concentrado de la composición (por ejemplo, gránulos o polvos) o se diluye (por ejemplo, suspensiones o dispersiones líquidas) para obtener una composición final para su aplicación a una planta.

Si la YBCA5 se deshidrata en la forma concentrada, entonces se requerirá la rehidratación como se conoce en la técnica si se pretende que la composición para su aplicación a la planta esté en forma líquida. La rehidratación puede llevarse a cabo usando las precauciones habituales para rehidratar la levadura como se conoce en la técnica; por ejemplo, la rehidratación se puede lograr ventajosamente a temperaturas entre 20 y 25 °C, pero sin limitarse a esto.

MÉTODOS - *Pseudomonas* spp.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de control de bacterias *Pseudomonas* spp. en una planta o parte de la misma, comprendiendo el método poner en contacto la planta o parte de la misma con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para controlar bacterias *Pseudomonas* spp. en una planta o parte de la misma.

En una realización, el método o uso comprende poner en contacto la planta o parte de la misma con células reproductivamente viables de YBCA5.

En algunas realizaciones, la concentración de células viables de YBCA5 en una composición de la invención varía de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{14} , preferiblemente de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^{11} , preferiblemente de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^9 , preferiblemente de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 , preferiblemente de aproximadamente 2×10^7 a aproximadamente 2×10^8 UFC, preferiblemente de aproximadamente 2×10^9 a aproximadamente 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 UFC por mililitro para composiciones líquidas.

En algunas realizaciones, la concentración de células viables de YBCA5 en una composición de la invención varía de 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{14} , preferiblemente de 1×10^5 a aproximadamente 1×10^{11} , preferiblemente de 1×10^6 a aproximadamente 1×10^9 , preferiblemente de 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 , preferiblemente de 2×10^7 a aproximadamente 2×10^8 UFC, preferiblemente de 2×10^9 a aproximadamente 2×10^{10} UFC por gramo para

composiciones sólidas, y de 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 UFC por mililitro para composiciones líquidas.

5 En algunas realizaciones, la concentración de células viables de YBCA5 en una composición de la invención varía de aproximadamente 1×10^3 a 1×10^{14} , preferiblemente de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^{11} , preferiblemente de aproximadamente 1×10^6 a 1×10^9 , preferiblemente de aproximadamente 1×10^7 a 1×10^8 , preferiblemente de aproximadamente 2×10^7 a 2×10^8 UFC, preferiblemente de aproximadamente 2×10^9 a 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y de aproximadamente 1×10^7 a 1×10^8 UFC por mililitro para composiciones líquidas.

10 En algunas realizaciones, la concentración de células viables de YBCA5 en una composición de la invención varía de 1×10^3 a 1×10^{14} , preferiblemente de 1×10^5 a 1×10^{11} , preferiblemente de 1×10^6 a 1×10^9 , preferiblemente de 1×10^7 a 1×10^8 , preferiblemente de 2×10^7 a 2×10^8 UFC, preferiblemente de 2×10^9 a 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y de 1×10^7 a 1×10^8 UFC por mililitro para composiciones líquidas.

15 En algunas realizaciones, la concentración de células viables de YBCA5 en una composición de la invención es de aproximadamente 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y aproximadamente 2×10^7 UFC por mililitro para composiciones líquidas.

20 En algunas realizaciones, la concentración de células viables de YBCA5 en una composición de la invención es de al menos 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y al menos 2×10^7 UFC por mililitro para composiciones líquidas, preferiblemente la concentración de células viables de YBCA5 en una composición de la invención es de 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y 2×10^7 UFC por mililitro para composiciones líquidas.

25 En una realización, la al menos una cepa de *Pseudomonas* spp. se selecciona del grupo que consiste en *P. syringae*, *P. amygdalia*, *P. avellanae*, *P. caricapapayae*, *P. cichorii*, *P. coronafaciens*, *P. ficuserectae*, *P. helianthi*, *P. lemiae*, *P. savastanoi* y *P. viridiflava*, o una patovariedad de las mismas, o combinaciones de las mismas. Preferiblemente, la al menos una cepa es *P. syringae* o una patovariedad de la misma, más preferiblemente la al menos una cepa es *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa).

30 En una realización, la planta o parte de la misma se selecciona del grupo de plantas monocotiledóneas, plantas dicotiledóneas, plantas anuales, bianuales y perennes, plantas u hortalizas cosechadas, plantas o árboles frutales o frutos cosechados, plantas o árboles con flores o flores cosechadas, plantas de cereales, plantas oleaginosas, plantas proteicas, plantas leñosas y plantas ornamentales.

35 En una realización, la planta o parte de la misma es una planta agrícolamente importante, cultivar de la misma, o producto de la misma seleccionada del grupo que consiste en plantas de importancia agrícola, vegetales de importancia agrícola y plantas frutales de importancia agrícola, y cultivares y productos de los mismos. Preferiblemente, la planta de importancia agrícola es una planta de kiwi o cultivar de la misma, y el producto es kiwi.

40 En una realización, la planta de kiwi se selecciona del grupo que consiste en especies de kiwi de pulpa verde (*A. chinensis* var. *deliciosa*), kiwi dorado (*A. chinensis* var. *Chinensis*), grosella espinosa china (*A. coriacea*), kiwi bebé (*A. Arguta*), kiwi ártico (*A. kolomikta*), kiwi rojo (*A. melanandra*, *A. chinensis* var. *chinensis*), planta de plata (*A. poligama*) y kiwi morado (*A. purpurea*) o un cultivar del mismo. Preferiblemente, los kiwis se seleccionan del grupo que consiste en *A. chinensis* var. *deliciosa* y *A. chinensis* var. *chinensis*, especie o un cultivar de los mismos. Preferiblemente, el kiwi es una especie de *A. chinensis* var. *chinensis*. Preferiblemente, el kiwi es *A. chinensis* var. *chinensis* Planch.

45 Preferiblemente, el cultivar es un "Hayward" o "Hort16A" o "zesy002", conocido informalmente como Gold3 o "Hongyang".

50 En una realización, el cultivar es *A. chinensis* var. *chinensis* Planch, "Hort16A". En una realización, el cultivar es "Hort16A" como se divulga en el documento USPP11066.

En una realización, el cultivar es *A. chinensis* var. *deliciosa* "Hayward". En una realización, el cultivar es "Hayward" como se divulga en el documento USPP6815.

55 En una realización, el cultivar es *A. chinensis* var. *chinensis* Planch, "Hongyang". En una realización, el cultivar es "Hongyang" como se divulga en Wang 2011 y en Li *et al* 2015.

En otro aspecto, la invención se refiere a YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para su uso, o cuando se usa, para controlar bacterias *Pseudomonas* spp. en una planta o parte de la misma.

60 El uso de YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para controlar bacterias *Pseudomonas* spp., y/o para aumentar el rendimiento de una planta de kiwi se lleva a cabo de acuerdo con los métodos de la invención como se describe en el presente documento. Por ejemplo, YBCA5 y composiciones de la misma pueden prepararse, formularse para y aplicarse a una planta, o parte de la misma, particularmente una planta de kiwi, o parte de la misma, de acuerdo con la invención tal como se describe en el presente documento.

65 En otro aspecto, la invención se refiere a un método de control de al menos un hongo fitopatógeno en una planta o

parte de la misma, comprendiendo el método poner en contacto la planta o parte de la misma con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para aumentar el rendimiento de una planta de fruta u hortaliza susceptible de infección por un hongo fitopatógeno, comprendiendo el método aplicar YBCA5 o una composición que comprende YBCA5 a la planta de fruta u hortaliza o parte de la misma, y hacer crecer la planta o parte de la misma. En una realización, la composición consiste esencialmente en YBCA5.

En una realización, el al menos un hongo fitopatógeno se selecciona del grupo que consiste en *Botrytis* spp., *Monilinia* spp., *Sclerotinia* spp., *Colletotrichum* spp., *Alternaria* spp., *Cryptosporiopsis* spp., *Phomopsis* spp. y *Penicillium* spp.

En una realización, la planta o parte de la misma se selecciona del grupo de plantas monocotiledóneas, plantas dicotiledóneas, plantas anuales, bianuales y perennes, plantas u hortalizas cosechadas, plantas o árboles frutales o frutos cosechados, plantas o árboles con flores o flores cosechadas, plantas de cereales, plantas oleaginosas, plantas proteicas, plantas leñosas y plantas ornamentales.

En una realización, la planta o parte de la misma es una planta agrícola importante, cultivar de la misma, o producto de la misma seleccionada del grupo que consiste en plantas de importancia agrícola y árboles frutales de importancia agrícola, vegetales de importancia agrícola y cultivares y productos de los mismos. En una realización, la planta de importancia agrícola es una planta de kiwi o cultivar de la misma, y el producto es kiwi.

En una realización, la planta o parte de la misma es una planta de fruta u hortaliza o parte de la misma, comprendiendo el método poner en contacto la planta de fruta u hortaliza o parte de la misma con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5. En algunas realizaciones, la planta de fruta u hortaliza es un cerezo o una vid. En algunas realizaciones, la planta de fruta es un manzano.

En una realización, el cerezo es un *Prunus* spp., o una cultivar del mismo, preferiblemente un *P. avium*, o cultivar del mismo. Preferiblemente, el *P. avium* es una variedad "Sweet Valentine". En una realización, la parte de la misma es una flor o parte de la misma o un fruto o parte del mismo. En una realización, la fruta es una cereza.

En una realización, la vid es una *Vitis* spp., o un cultivar de la misma, preferiblemente una *V. vinifera*, o cultivar de la misma. Preferiblemente, la *V. vinifera* es una variedad "Thompson Seedless". En una realización, la parte de la misma es una flor o parte de la misma o un fruto o parte del mismo. En una realización, la fruta es una uva.

En una realización, el manzano es un *Malus* spp., o un cultivar del mismo, preferiblemente *M. pumila* o cultivar del mismo. Preferiblemente, el *M. pumila* o un cultivar del mismo es una variedad "Pacific Rose". En una realización, la parte de la misma es una flor o parte de la misma o un fruto o parte del mismo. En una realización, la fruta es una manzana.

Control de *Psa*

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para controlar *P. syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*) en una planta de kiwi o parte de la misma, comprendiendo el método poner en contacto la planta de kiwi o parte de la misma con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para aumentar el rendimiento de una planta de kiwi infectada o susceptible de infección con *Psa*, comprendiendo el método aplicar YBCA5 o una composición que comprende YBCA5 a la planta de kiwi o parte de la misma, y hacer crecer la planta de kiwi o parte de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para controlar *Psa* en una planta de kiwi o parte de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para aumentar el rendimiento de una planta de kiwi infectada o susceptible de infección con *Psa*.

En una realización, la composición consiste esencialmente en YBCA5.

En una realización, la planta del kiwi es una especie de *A. chinensis* var. *deliciosa* o *A. chinensis* var. *chinensis*, o una variedad de la misma, preferiblemente una especie de *A. chinensis* var. *chinensis*, o cultivar de la misma. En una realización, la planta de kiwi es "Hort16A".

En una realización, el cultivar es *A. chinensis* var. *chinensis* "Hongyang". En una realización, el cultivar es "Hongyang" como se divulga en Wang 2011 y en Li *et al* 2015.

En una realización, una planta o parte de la misma se pone en contacto durante un tiempo suficiente para controlar *Psa*.

- En una realización, el contacto comprende aplicar YBCA5 o una composición que comprende o que consiste esencialmente en YBCA5 a la planta o parte de la misma mediante aplicación a las semillas, hojas, tallos, flores, frutos, troncos y/o raíces de la planta o parte de la misma. Preferiblemente, la aplicación es mediante pulverización, 5 brumización, inmersión, goteo, espolvoreado o rociado. Las aplicaciones se pueden realizar una sola vez o repetidamente según sea necesario. También se contempla en el presente documento la aplicación en diversas épocas del año y/o durante diversas fases del ciclo de vida de la planta, según lo determine apropiado el trabajador experto.
- 10 YBCA5 puede aplicarse en el momento apropiado durante el año y en la fase apropiada del desarrollo de la planta según lo determine un trabajador experto. Por ejemplo, YBCA5 puede aplicarse desde la brotación hasta la floración, durante el período de floración y después de la floración/cuajado de frutos, pero sin limitarse a los mismos.
- 15 En una realización, la aplicación es mediante pulverización sobre las superficies foliares y/o sobre las flores y/o sobre las frutas y/o sobre las hortalizas.
- En una realización, la aplicación a las raíces es mediante pulverización terrestre, incorporación mecánica o mediante mezclado con agentes enriquecedores o fertilizantes antes de la aplicación de la manera habitual.
- 20 En una realización, la planta o parte de la misma se selecciona de plantas monocotiledóneas, plantas dicotiledóneas, plantas anuales, bianuales y perennes, plantas u hortalizas cosechadas, plantas o árboles frutales o frutos cosechados, plantas o árboles con flores o flores cosechadas, plantas de cereales, plantas oleaginosas, plantas proteicas, plantas leñosas y plantas ornamentales.
- 25 En una realización, una planta o parte de la misma es una planta de cultivo agrícolamente importante, cultivar o producto de la misma seleccionada de plantas de maíz, plantas de tabaco, plantas de trigo, plantas de caña de azúcar, plantas de colza, plantas de cebada, plantas de arroz, plantas de sorgo, plantas de mijo, plantas de soja, plantas de lechuga y plantas de col.
- 30 En una realización, la planta o parte de la misma es una planta agrícolamente importante, cultivar de la misma, o producto de la misma seleccionada del grupo que consiste en plantas de importancia agrícola y árboles frutales de importancia agrícola, y cultivares y productos de los mismos. Preferiblemente, los árboles frutales de importancia agrícola o cultivares de los mismos se seleccionan de olivos, manzanos, perales, árboles frutales cítricos, plataneros, 35 árboles de piña, melocotoneros, albaricoqueros, cerezos, nogales y avellanos y los productos de los mismos son aceitunas, manzanas, peras, frutas cítricas, plátanos, piñas, melocotones, albaricoques, cerezas, nueces y avellanas respectivamente. Preferiblemente, las plantas de importancia agrícola o cultivares de las mismas se seleccionan de plantas de patata, plantas de remolacha, plantas de frijol, plantas de guisantes, plantas de tomate, plantas de pepino, plantas de melón, plantas de bayas, vides y plantas de kiwi y los productos de los mismos son patatas, remolachas rojas, judías, guisantes, tomates, pepinos, melones, bayas, uvas y kiwis respectivamente. Preferiblemente, la planta 40 de importancia agrícola es una planta de kiwi o cultivar de la misma, y el producto es kiwi.
- Los kiwis están dentro del orden de plantas *Ericales* y la familia *Actinidiaceae*. En una realización, la planta de kiwi se selecciona del grupo que consiste en especies de fuzzy kiwi (*A. chinensis* var. *deliciosa*), kiwi dorado (*A. chinensis* var. *chinensis*), grosella espinosa china (*A. coriacea*), kiwi bebé (*A. Arguta*), kiwi ártico (*A. kolomikta*), kiwi rojo (*A. melanandra*, *A. chinensis* var. *chinensis*), planta de plata (*A. poligama*) y kiwi morado (*A. purpurea*) o un cultivar del mismo. Preferiblemente, los kiwis se seleccionan del grupo que consiste en la especie *A. chinensis* var. *deliciosa*, *A. chinensis* var. *chinensis* o un cultivar de la misma. Preferiblemente, el kiwi es una especie de *A. chinensis* var. *chinensis*. Preferiblemente, el kiwi es preferiblemente *A. chinensis* var. *chinensis* Planch. Preferiblemente, el cultivar es un cultivar de variedad "Hayward" o "Hort 16A" o "Zesy002" o "Zesy004" o "Hongyang".
- 50 En una realización, el cultivar es *A. chinensis* var. *chinensis* Planch, "Hort 16A". En una realización, el cultivar es "Hort 16A" como se divulga en el documento USPP11066.
- En una realización, el cultivar es *A. chinensis* var. *deliciosa* "Hayward". En una realización, el cultivar es "Hayward" como se divulga en el documento USPP6815.
- 55 En una realización, el cultivar es *A. chinensis* var. *chinensis* "Hongyang". En una realización, el cultivar es "Hongyang" como se divulga en Wang 2011 y en Li *et al* 2015.
- 60 En otro aspecto, la invención se refiere a YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para su uso, o cuando se usa, para controlar la Psa en una planta de kiwi o parte de la misma.
- En otro aspecto, la invención se refiere a YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para su uso, o cuando se usa, para aumentar el rendimiento de una planta de kiwi infectada o susceptible de infección con Psa.
- 65 El uso de YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para controlar Psa y/o para aumentar el rendimiento de

una planta de kiwi se lleva a cabo de acuerdo con los métodos de la invención como se describe en el presente documento. Por ejemplo, YBCA5 y composiciones de la misma pueden prepararse, formularse para y aplicarse a una planta, o parte de la misma, particularmente una planta de kiwi, o parte de la misma, de acuerdo con la invención tal como se describe en el presente documento.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a al menos una planta o parte de la misma tratada con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5. En algunas realizaciones, la planta es una planta de fruta u hortaliza o parte de la misma. En una realización, la planta es una planta de kiwi, un cerezo o una vid.

10 *Control de hongos fitopatógenos*

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de control de al menos un hongo fitopatógeno en una planta o parte de la misma, comprendiendo el método poner en contacto la planta o parte de la misma con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para aumentar el rendimiento de una planta de fruta u hortaliza susceptible de infección por un hongo fitopatógeno, comprendiendo el método aplicar YBCA5 o una composición que comprende YBCA5 a la planta de fruta u hortaliza o parte de la misma, y hacer crecer la planta o parte de la misma.

20 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para controlar un hongo fitopatógeno en una planta e fruta u hortaliza o parte de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para aumentar el rendimiento de una planta de fruta u hortaliza o parte de la misma susceptible de infección por un hongo fitopatógeno.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para su uso, o cuando se usa, para controlar al menos un hongo fitopatógeno en una planta o parte de la misma.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para su uso, o cuando se usa, para controlar al menos un hongo fitopatógeno en una planta de fruta u hortaliza o parte de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere a YBCA5, o una composición que comprende YBCA5 para su uso, o cuando se usa, para aumentar el rendimiento de una planta de fruta u hortaliza susceptible de infección por al menos un hongo fitopatógeno.

35 Las siguientes realizaciones también se contemplan específicamente para aquellos aspectos de la invención que se refieren al uso de YBCA5, o a una composición que comprende o consiste esencialmente en YBCA5, para controlar hongos fitopatógenos y/o para aumentar el rendimiento de una planta o parte de la misma, o de una planta de fruta u hortaliza o parte de la misma, susceptibles a la infección por un hongo fitopatógeno.

40 En una realización, el un hongo fitopatógeno se selecciona del grupo que consiste en *Botrytis* spp., *Monilinia* spp., *Sclerotinia* spp., *Colletotrichum* spp., *Alternaria* spp., *Cryptosporiopsis* spp., *Phomopsis* spp. y *Penicillium* spp.

45 En una realización, la planta o parte de la misma se selecciona del grupo de plantas monocotiledóneas, plantas dicotiledóneas, plantas anuales, bianuales y perennes, plantas u hortalizas cosechadas, plantas o árboles frutales o frutos cosechados, plantas o árboles con flores o flores cosechadas, plantas de cereales, plantas oleaginosas, plantas proteicas, plantas leñosas y plantas ornamentales.

50 En una realización, la planta o parte de la misma es una planta agrícola importante, cultivar de la misma, o producto de la misma seleccionada del grupo que consiste en plantas de importancia agrícola y árboles frutales de importancia agrícola, vegetales de importancia agrícola y cultivares y productos de los mismos. En una realización, la planta de importancia agrícola es una planta de kiwi o cultivar de la misma, y el producto es kiwi.

55 En una realización, la planta o parte de la misma es una planta de fruta u hortaliza o parte de la misma, comprendiendo el método poner en contacto la planta de fruta u hortaliza o parte de la misma con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5. En algunas realizaciones, la planta de fruta u hortaliza es un cerezo o una vid. En algunas realizaciones, la planta de fruta es un manzano.

60 En una realización, el cerezo es un *Prunus* spp., o una cultivar del mismo, preferiblemente un *P. avium*, o cultivar del mismo. Preferiblemente, el *P. avium* es una variedad "Sweet Valentine". En una realización, la parte de la misma es una flor o parte de la misma o un fruto o parte del mismo. En una realización, la fruta es una cereza.

65 En una realización, la vid es una *Vinus* spp., o un cultivar de la misma, preferiblemente una *V. vinifera*, o cultivar de la misma. Preferiblemente, la *V. vinifera* es una variedad "Thompson Seedless". En una realización, la parte de la misma es una flor o parte de la misma o un fruto o parte del mismo. En una realización, la fruta es una uva.

En una realización, el manzano es un *Malus* spp., o un cultivar del mismo, preferiblemente *M. pumila* o un cultivar del mismo. Preferiblemente, el *M. pumila* es una variedad "Pacific Rose". En una realización, la parte de la misma es una flor o parte de la misma o un fruto o parte del mismo. En una realización, la fruta es una manzana.

En otro aspecto, la invención se refiere a al menos una planta o parte de la misma tratada con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5.

En otro aspecto, la invención se refiere a al menos una planta de fruta u hortaliza o parte de la misma tratada con YBCA5, o una composición que comprende YBCA5.

En una realización, la composición consiste esencialmente en YBCA5.

El uso de YBCA5, o una composición que comprende o que consiste esencialmente en YBCA5 para controlar hongos fitopatógenos y/o para aumentar el rendimiento de una planta o parte de la misma, o de una planta de fruta u hortaliza o parte de la misma se lleva a cabo de acuerdo con los métodos y usos de la invención como se describe en el presente documento. Por ejemplo, YBCA5 y composiciones de la misma pueden prepararse, formularse para y aplicarse a una planta, o parte de la misma, particularmente una planta de fruta u hortaliza, o parte de la misma, en particular, un cerezo o una vid de acuerdo con la invención tal como se describe en el presente documento.

A continuación, se ilustrarán diversos aspectos de la invención de formas no limitativas haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

EJEMPLO 1 - Identificación de levaduras con actividad de control biológico

Cribado de levadura

YBCA5 se aisló de albaricoques ("Clutha Gold") del centro de Otago a principios de la década de 2000 de la siguiente manera. Los albaricoques frescos, recolectados se congelaron durante la noche a -20 °C y luego se incubaron a 20 °C durante hasta 5 días. Las colonias de levadura o similares a levadura que crecen en la superficie de albaricoques seleccionados se aislaron usando protocolos estándar en un medio de cultivo general adecuado para la propagación de levadura.

EJEMPLO 2 - Control biológico de levadura de *Pseudomonas syringae* var. *actinidiae* (Psa)

Metodologías generales

Los ensayos de cribado basados en plantas se realizaron en laboratorios e invernaderos en el Centro de Investigación de Ruakura, Hamilton y en el huerto de investigación Te Puke, Te Puke, Nueva Zelanda. Los ensayos de plantas y alimentos (PFR) se centraron en la aplicación foliar de agentes de control biológico (BCA), particularmente YBCA5 y otras cepas de levadura patentadas de PFR.

Ensayo Zespri 26 - tasa de dosis de YBCA5

El objetivo de este ensayo fue comparar varias tasas de dosis de YBCA5 recién fermentada con una preparación formulada y secada de YBCA5 para determinar su eficacia contra Psa.

Material vegetal

El ensayo Zespri 26 se llevó a cabo en el invernadero PC1 en Ruakura utilizando tejido cultivado de plantas *A. chinensis* var. *deliciosa* "Hayward" cultivadas en macetas de 1 l. Las plantas tenían 30-50 cm de altura, cada una con al menos 4-5 hojas utilizables por planta y el tiempo de tratamiento y hubo 10 plantas replicadas por tratamiento.

Preparación de levadura

Se obtuvo YBCA5 recién fermentada mediante fermentación de la levadura durante 3 días en un biorreactor de 10 l (Labfors) usando medios líquidos estériles (4 % de melaza y 1,2 g/l de urea). El fermentado se centrifugó en una centrifugadora (Sorvall RC-5C) a 5000 rpm durante 15 min (rotor n.º SLC-4000, código de rotor 33) para lograr un sedimento húmedo de concentrado celular después de descartar el sobrenadante. Se resuspendió una submuestra de sedimento húmedo y se determinó la densidad celular con la ayuda de un hemocitómetro y se realizaron diluciones apropiadas para lograr concentraciones de pulverización finales de 6×10^6 , $1,25 \times 10^7$, $2,5 \times 10^7$ y $5,0 \times 10^7$ UFC/ml.

Los gránulos de YBCA5 se prepararon mediante mezclado del sedimento húmedo de una fermentación anterior en el fermentador de 10 l, con aproximadamente un 30 % (p/p) de almidón de maíz para formar una consistencia de masa

rígida y esta se extruyó a través de una malla de acero (tamaño de orificio de 3 mm) y se secó en una campana de flujo laminar durante la noche (20-25 °C) para formar gránulos secados.

El número de UFC en los gránulos secados de YBCA5 se calculó disolviendo completamente 0,2 g de gránulos en 20 ml de PBSTw. Se llevaron a cabo diluciones en serie de esta solución madre (hasta 10⁻⁶) y se transfirieron tres gotas de 10 µl de cada dilución a MYA. El número de colonias de levadura que crecían de cada gota se contó después de 24 h de incubación a 25 °C seguido de una incubación adicional de 24 h en una nevera (4-6 °C). Una concentración de pulverización de 2,5 × 10⁷ UFC/ml se preparó pesando la cantidad apropiada de gránulos en 500 ml de agua.

10 Preparación de inóculo de Psa

Un cultivo de Psa (código de aislado 10627, biovar 3), que se había aislado de una planta de kiwi *Actinidia chinensis* var. *chinensis* "Hort16A" infectada ubicada en la región de Te Puke durante 2010, se utilizó para todos los ensayos de inoculación por punción y pulverización incluidos en este informe (Vanneste *et al.* 2013). El inóculo de Psa se preparó cultivando esta cepa de Psa durante 2-3 días en medio King's B (KB) y recogiendo las bacterias lavando la placa con agua destilada estéril (SDW) para preparar una suspensión madre de inóculo que se determinó visualmente que era c. >1 × 10⁹ UFC/ml. Una submuestra de esta solución madre de Psa se diluyó en serie y se colocaron gotas de 10 µl en medio KB fresco para que el número de UFC/ml pudiera contarse después de la incubación de dos días. Para facilitar la inoculación de gotas en el invernadero (Ruakura), se determinó la densidad óptica del inóculo de Psa (solución madre c. × 10⁹ UFC/ml) usando un espectrofotómetro (600 nm) y luego la solución se diluyó con PBS estéril para dar suspensiones resultantes de 5 × 10⁸ UFC/ml y 2 × 10⁷ UFC/ml, basándose en una curva de calibración previamente desarrollada. El adyuvante, Du-Wett se añadió entonces a la suspensión para dar una concentración final del 0,03 % (v/v).

25 Ensayo de inoculación por pulverización foliar

Los días 11 y 18 de septiembre de 2014, se aplicaron tratamientos por pulverización de cada concentración de YBCA5 recién fermentada y la preparación de gránulos a la escorrentia a todas las hojas en cada planta que se había cultivado en macetas en un invernadero, 7 y 1 días antes de la inoculación (dai) con las dos dosis de Psa y las plantas se dejaron secar en un cobertizo de contención de pulverización. Una vez secas, las plantas tratadas por pulverización se devolvieron al invernadero. Un día después del segundo tratamiento por pulverización con YBCA5, el 19 de septiembre de 2014, se pipeteó el inóculo de Psa (10 µl) en la parte inferior de cada hoja en pares a cada lado de la nervadura media de cuatro o cinco hojas seleccionadas (evitando las hojas más viejas y las más jóvenes). Luego, las plantas se colocaron en tiendas de campaña de alta humedad en invernaderos de contención en PFR Ruakura después de la inoculación con Psa durante hasta tres semanas y luego se calificaron para determinar la gravedad de Psa.

Medición de los síntomas de Psa

El área (mm²) de necrosis causada por Psa se estimó visualmente para cada punto de inoculación 21 días después de la inoculación de gotas de Psa. Para garantizar la coherencia, solo dos miembros del personal llevaron a cabo evaluaciones de gravedad de la hoja con Psa con una verificación cruzada regular de las puntuaciones de gravedad.

Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron usando GenStat después de la transformación logarítmica natural. Se presentan medias de datos sin procesar y las diferencias estadísticas se basan en el análisis transformado logarítmico.

Ensayo KRIP-BCA 39

El objetivo de este ensayo era investigar la fermentación, formulación y eficacia contra Psa de diferentes aislados de *Aureobasidium pullulans* en comparación con YBCA5.

Material vegetal

El ensayo KRIP-BCA 39 se llevó a cabo en el invernadero PC1 en Ruakura utilizando tejido cultivado de plantas *A. chinensis* var. *deliciosa* "Hayward" cultivadas en macetas de 1,5 l. Las plantas tenían 30-50 cm de altura, cada una con al menos 4-5 hojas utilizables por planta y el tiempo de tratamiento y hubo 10 plantas replicadas por tratamiento.

Preparación de levadura

Los gránulos de YBCA5 se prepararon mediante fermentación de la levadura durante 3 días en un biorreactor de 10 l (Labfors) usando medios líquidos estériles (4 % de melaza y 1,2 g/l de urea). El fermentado se centrifugó en una centrifugadora (Sorvall RC-5C) a 5000 rpm durante 15 min (rotor n.º SLC-4000, código de rotor 33) para lograr un sedimento húmedo de concentrado celular después de descartar el sobrenadante. Ese sedimento húmedo se mezcló con aproximadamente un 30 % (p/p) de almidón de maíz para formar una consistencia de masa rígida y esta se extruyó

a través de una malla de acero (tamaño de orificio de 3 mm) y se secó en una campana de flujo laminar durante la noche (20-25 °C) para formar gránulos secados.

Doce aislados de *A. pullulans* seleccionados de una gran colección de cultivos se fermentaron durante 3 días en cultivo en matraz (200 ml de melaza al 4 %, 1,2 g/l de medio líquido estéril de urea en matraces cónicos de 500 ml). El número de unidades formadoras de colonias (UFC) viables se determinó submuestreando 1 ml de fermentado y realizando diluciones en serie (hasta 10⁻⁷) en solución salina tamponada con fosfato 0,05 M + Tween80 al 0,05 % (PBSTw). Para cada dilución, se transfirieron tres gotas de 10 µl sobre agar de extracto de levadura de malta (MYA). Este número de colonias de levadura que crecían de cada gota se contó después de 24 h de incubación a 25 °C seguido de una incubación adicional de 24 h en una nevera (4-6 °C). A continuación, el fermentado se procesó como se ha descrito anteriormente para YBCA5 para formar gránulos formulados secados.

El número de UFC en los gránulos secados para cada aislado de *A. pullulans* se calculó disolviendo completamente 0,2 g de gránulos en 20 ml de PBSTw. Se llevaron a cabo diluciones en serie de esta solución madre (hasta 10⁻⁶) y se transfirieron tres gotas de 10 µl de cada dilución a MYA. Este número de colonias de levadura que crecían de cada gota se contó después de 24 h de incubación a 25 °C seguido de una incubación adicional de 24 h en una nevera (4-6 °C). Las composiciones para aplicaciones por pulverización se prepararon pesando la cantidad apropiada de gránulos en 500 ml de agua.

Preparación de inóculo de *Psa*

Un cultivo de *Psa* (código de aislado 10627, biovar 3), que se había aislado de una planta de kiwi *Actinidia chinensis* var. *chinensis* "Hort16A" infectada ubicada en la región de Te Puke durante 2010, se utilizó para todos los ensayos de inoculación por punción y pulverización incluidos en este informe (Vanneste *et al.* 2013). El inóculo de *Psa* se preparó cultivando esta cepa de *Psa* durante 2-3 días en medio King's B (KB) y recogiendo las bacterias lavando la placa con agua destilada estéril (SDW) para preparar una suspensión madre de inóculo que se determinó visualmente que era c. >1 × 10⁹ UFC/ml. Una submuestra de esta solución madre de *Psa* se diluyó en serie y se colocaron gotas de 10 µl en medio KB fresco para que el número de UFC/ml pudiera contarse después de la incubación de dos días. Para facilitar la inoculación de gotas en el invernadero (Ruakura), se determinó la densidad óptica del inóculo de *Psa* (solución madre c. × 10⁹ UFC/ml) usando un espectrofotómetro (600 nm) y luego la solución se diluyó con PBS estéril para dar suspensiones resultantes de 1 × 10⁸ UFC/ml, basándose en una curva de calibración previamente desarrollada. El adyuvante, Du-Wett se añadió entonces a la suspensión para dar una concentración final del 0,03 % (v/v).

Ensayos de inoculación por pulverización foliar

El 9 de mayo de 2016, se aplicaron tratamientos por pulverización de cada aislado de *A. pullulans* y YBCA5 a la escorrentía a todas las hojas en cada planta que se había cultivado en macetas en un invernadero, 7 días antes de la inoculación (dai) con *Psa* (1 × 10⁸ UFC/ml). Todos los tratamientos con *A. pullulans*, incluyendo YBCA5 se aplicaron a una concentración final de 2 × 10⁷ UFC/ml y las plantas se dejaron secar en un cobertizo de contención de pulverización. Una vez secas, las plantas tratadas por pulverización se devolvieron al invernadero. Siete días después del tratamiento por pulverización, el 16 de mayo de 2016, se pipeteó la dosis de inóculo de *Psa* (10 µl) en la parte inferior de cada hoja en pares a cada lado de la nervadura media de cuatro o cinco hojas seleccionadas (evitando las hojas más viejas y las más jóvenes). Luego, las plantas se colocaron en tiendas de campaña de alta humedad en invernaderos de contención en PFR Ruakura después de la inoculación con *Psa* durante hasta tres semanas y luego se calificaron para determinar la gravedad de *Psa*.

Medición de los síntomas de *Psa*

El área (mm²) de necrosis causada por *Psa* se estimó visualmente para cada punto de inoculación 21 días después de la inoculación de gotas de *Psa*. Para garantizar la coherencia, solo dos miembros del personal llevaron a cabo evaluaciones de gravedad de la hoja con *Psa* con una verificación cruzada regular de las puntuaciones de gravedad.

Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron usando GenStat después de la transformación logarítmica natural. Se presentan medias de datos sin procesar y las diferencias estadísticas se basan en el análisis transformado logarítmico.

Resultados - ensayo de tasa de dosis

La Figura 1 muestra que YBCA5 es muy eficaz para reducir la gravedad de los síntomas de *Psa* en hojas de kiwi "Hayward". Todas las tasas de dosis usadas en este experimento redujeron significativamente (P<0,001) la gravedad de la necrosis foliar en comparación con el control no tratado. No hubo diferencia en la eficacia en la preparación de gránulos de YBCA5 en comparación con YBCA5 recién fermentada.

Resultados - Fermentación y formulación

El rendimiento de fermentación para los 12 aislados de *A. pullulans* cultivados en matraces oscilaba de $1,3 \times 10^8$ UFC/ml a $2,3 \times 10^9$ UFC/ml y el rendimiento de fermentación para YBCA5 cultivada en matraz fue de $3,3 \times 10^8$ UFC/ml (Tabla 1), lo que indica que algunos aislados son capaces de producir rendimientos de fermentación más altos en comparación con YBCA5, mientras que otros producen rendimientos de fermentación más bajos.

El número de UFC/g para gránulos secados de YBCA5 (de 10 l de fermentación) fue de $2,3 \times 10^{10}$ y para los 12 aislados de *A. pullulans* el número de UFC/g para gránulos secados osciló desde un mínimo de $3,1 \times 10^9$ UFC/g hasta $2,0 \times 10^{10}$ UFC/g (Tabla 1), lo que indica que la mayoría de los aislados de *A. pullulans* produjeron un rendimiento menor de UFC/g viables que YBCA5.

Una comparación del número de UFC en los gránulos por ml de líquido de fermentación (para permitir una comparación más directa de la fermentación de 10 l de YBCA5 y el cultivo en matraz de los 12 aislados de *A. pullulans*) muestra que el YBCA5 tiene el rendimiento más alto (4×10^8 UFC/ml) y para el otro aislado de *A. pullulans* éste osciló desde tan solo $4,2 \times 10^7$ UFC/ml hasta $2,4 \times 10^8$ UFC/ml (Tabla 1).

Tabla 1. Rendimiento de fermentación y rendimiento de formulación para una gama de aislados de *Aureobasidium pullulans*, incluyendo YBCA5.

Código de cultivo de <i>A. pullulans</i>	Rendimiento del matraz cónico (esporas/ml)	Peso seco de gránulos (g)	UFC/g de gránulos	Esporas totales	UFC/ml de gránulos de líquido de fermentación
YBCA5	3,3E+08	174*	2,30E+10*	4,04E+12*	4,0E+08*
CG 173	ND**	9	2,00E+10	1,80E+11	2,2E+08
HB 229	ND	9,4	1,40E+10	1,30E+11	1,6E+08
HRV 212	ND	7,6	1,80E+10	1,40E+11	1,7E+08
HB 228	ND	9,8	1,90E+10	1,90E+11	2,4E+08
HB226	2,3E+09	12	1,60E+10	1,90E+11	2,4E+08
HB201	1,4E+08	9,9	6,10E+09	6,00E+10	7,5E+07
FOR 5-8-1	2,3E+09	10	1,60E+10	1,60E+11	2,0E+08
GIS 08 4/1	2,3E+09	13,7	5,30E+09	7,30E+10	9,1E+07
HB 303	8,8E+09	10,8	3,10E+09	3,40E+10	4,2E+07
FOR6-1-1	1,3E+08	10,7	9,80E+09	1,10E+11	1,4E+08
HBR018	2,3E+08	7,9	1,50E+10	1,20E+11	1,5E+08
MSB 8-6-2	2,6E+08	8	1,10E+10	8,80E+10	1,1E+08

* Para YBCA5 estos datos son la media de tres lotes fermentados usando el fermentador de 10 l.
 ** ND = Ningún dato.

Resultados - Ensayo de inoculación de gotas foliar - eficacia (KRIP-BCA 39)

En el tratamiento Nil (solo más húmedo), el área de lesión por Psa promedio fue de 57 mm² (Figura 2). Un aislado (MSB8-6-2) no redujo significativamente ($P>0,05$) la gravedad de Psa (tamaño de la lesión = 54 mm²) en comparación con el control Nil. YBCA5 redujo significativamente el área de lesión por Psa a 43 mm² (eficacia = 25 %). Este ensayo demostró que no todos los aislados de *Aureobasidium pullulans* tienen la capacidad de reducir significativamente la gravedad de Psa en plantas de kiwi en maceta y la eficacia contra Psa depende del aislado seleccionado.

Ensayo Zespri 31

El objetivo de este ensayo fue comparar la eficacia de YBCA5 aplicada sola e integrada con cobre o Actigard para el control de Psa en plantas en maceta expuestas a inóculo de Psa natural en un huerto de investigación.

Material vegetal

Este ensayo se llevó a cabo en la estructura de la casa de sombra (Bloque 20) en el huerto de investigación Te Puke. Las plantas se cultivaron originalmente en el invernadero de Ruakura utilizando tejido cultivado de plantas *A. chinensis* var. *deliciosa* "Hayward" cultivadas en macetas de 1,5 l. Una vez que las plantas tenían 25 cm de altura, se trasplantaron en macetas de 2,5 l y se trasladaron a la casa de sombra de Ruakura y se conectaron al riego por goteo el 30 de octubre de 2015. En el momento del tratamiento el 3 de noviembre de 2015, cada planta tenía al menos 4 hojas utilizables por planta y había 15 plantas replicadas por tratamiento. Los tratamientos y las fechas de pulverización foliar se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Programa de tratamiento para plantas "Hayward" en macetas expuestas a inóculo de Psa natural en el huerto de investigación Te Puke.

TRT n.º	1º tratamiento foliar	2º tratamiento foliar (+10 d)	3º tratamiento foliar (+10 d)	4º tratamiento foliar (+10 d)	Fundamento
---------	-----------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	------------

Sitio	Ruakura	TPRO	TPRO	TPRO	
Fecha de pulverización	3 de nov. de 2015	13 de nov. de 2015	23 de nov. de 2015	3 de dic. de 2015	
1.	Nu-Film*	Nu-Film	Nu-Film	Nu-Film	Control más húmedo
2.	Kocide**	Kocide	Kocide	Kocide	Estándar basado en cobre
3.	YBCA5	YBCA5	YBCA5	YBCA5	YBCA5
4.	Kocide	YBCA5	Kocide	YBCA5	Programa integrado I
5.	Actigard	YBCA5	Actigard	YBCA5	Programa integrado II
* Miller Chemical & Fertilizer Corporation, EE.UU.					
**DuPont, EE.UU.					

Preparación de levadura

Los gránulos de YBCA5 se prepararon mediante fermentación de la levadura durante 3 días en un biorreactor de 10 l (Labfors) usando medios líquidos estériles (4 % de melaza y 1,2 g/l de urea). El fermentado se centrifugó en una centrifugadora (Sorvall RC-5C) a 5000 rpm durante 15 min (rotor n.º SLC-4000, código de rotor 33) para lograr un sedimento húmedo de concentrado celular después de descartar el sobrenadante. Ese sedimento húmedo se mezcló con aproximadamente un 30 % (p/p) de almidón de maíz para formar una consistencia de masa rígida y esta se extruyó a través de una malla de acero (tamaño de orificio de 3 mm) y se secó en una campana de flujo laminar durante la noche (20-25 °C) para formar gránulos secados.

Todos los tratamientos de YBCA5 se aplicaron a una concentración final de 2×10^7 UFC/ml y las plantas se dejaron secar. El volumen final que se preparó osciló de 500 ml a un litro dependiendo del tamaño de las plantas que se estaban tratando.

Preparación de inóculo de Psa

El objetivo de este proyecto era exponer plantas en macetas al inóculo de Psa en el huerto de investigación Te Puke (Bloque 20). Este bloque estaba rodeado de plantas de kiwi maduras con antecedentes de Psa y esto proporcionó el inóculo durante el período de tiempo para este ensayo.

Pulverizaciones foliares

Los primeros tratamientos por pulverización se aplicaron en Ruakura el 3 de noviembre de 2016 y a intervalos de 10-14 días a partir de entonces. (Los detalles se describen en la Tabla 2 anterior). Todos los tratamientos se aplicaron justo antes de la escorrentía con un pulverizador de bomba manual. Hidróxido de cobre (Kocide Opti) aplicado a 0,7 g/l y Actigard se aplicó a 0,1 g/l. YBCA5 se aplicó con el adyuvante más húmedo/adhesivo, Nu-Film (250 ul por 500 ml).

Las evaluaciones de la enfermedad se llevaron a cabo el 17 de diciembre de 2015 estimando el porcentaje de área de necrosis foliar en todas las hojas tratadas.

Resultados - Ensayo Zespri 31

En ausencia de cualquier tratamiento (solo Nu-film, control), la incidencia de mancha foliar por Psa fue del 66 % y esto se redujo significativamente con Kocide Opti (18 %), YBCA5 (35 %), YBCA5 y Kocide Opti (programa integrado I) (15 %), YBCA5 y Actigard (programa integrado II) (22 %) (Figura 3).

Este ensayo demostró que YBCA5 redujo significativamente ($P < 0,05$) la incidencia de manchas foliares por Psa en plantas en macetas bajo una estructura sombreada cuando se exponen a inóculo de Psa natural. Aunque el nivel de control de enfermedades no fue tan efectivo como el programa basado en Kocide Opti, el ensayo demostró que YBCA5 podría integrarse con éxito con un producto a base de cobre y con Actigard sin pérdida significativa de eficacia en comparación con el tratamiento solo con cobre.

EJEMPLO 3 - Control biológico de levadura de hongos fitopatógenos

Control biológico de YBCA5 de *Monilinia fructicola* y *Botrytis* spp.

Métodos

Los ensayos de cribado basados en frutas se realizaron en laboratorios del Centro de Investigación Ruakura de Investigación de Plantas y Alimentos, Hamilton, Nueva Zelanda (PFR). Los ensayos de PFR se centraron en la

aplicación de tratamiento por inmersión de YBCA5 y controles de fungicidas.

Material de fruto (Ensayos 1 a 4)

- 5 Los ensayos de inoculación de fruta para *Monilinia fructicola* y *Botrytis* spp. Se llevaron a cabo en cerezas dulces (*Prunus avium* "Sweet Valentine") que se recogieron en la fase de madurez de cosecha y se obtuvieron del huerto de investigación PFR Clyde en Central Otago el 8 de enero de 2016 para los ensayos basados en frutas 1 y 2. Se llevó a cabo una segunda cosecha el 13 de enero de 2016 para los ensayos basados en frutos 3 y 4.
- 10 A continuación, cada cereza se sometió a un proceso de doble lavado. El lavado uno consistió en 10 minutos en agua del grifo en un agitador rotatorio (110 rpm) seguido de un lavado de cinco minutos en SDW (lavado 2). Todas las cerezas se colocaron sobre rejillas de plástico negro estériles en una bandeja de carne de plástico estéril con dos toallas de papel estériles y se dejaron secar en una campana de flujo laminar. Cada cereza se sumergió en los tratamientos durante 60 segundos y se dejó secar de nuevo, como se ha descrito anteriormente. Se añadieron 40 ml
- 15 de agua desionizada a las toallas de papel para garantizar una humedad relativa alta y, a continuación, se encerraron en una bolsa de plástico para incubar a 23 °C durante 24 h (ensayo 1) y 48 horas (ensayo 2) para permitir que se estableciera el tratamiento de YBCA5 en la superficie de la fruta.

Ensayo 5 Material de fruta

- 20 Los ensayos de frutas se llevaron a cabo en bayas de uva de mesa blanca desprendidas ("Thompson seedless" - Ensayo 5), importadas de California que se obtuvieron de un supermercado local en Hamilton. Cada baya se separó del racimo con 3-4 mm de pedicelo restante y luego se sometió a un proceso de doble lavado. El lavado uno consistió en 10 minutos en agua del grifo en un agitador rotatorio (110 rpm) seguido de un lavado de cinco minutos en SDW
- 25 (lavado 2). Todas las bayas se colocaron sobre rejillas de plástico negro estériles en una bandeja de carne de plástico estéril con dos toallas de papel estériles y se dejaron secar en una campana de flujo laminar. A cada baya se le hizo una herida ligeramente con la ayuda de papel de lija fino, grado P220, luego se sumergió en los tratamientos durante 60 segundos y se dejó secar nuevamente.

30 *Preparación de YBCA5 (Ensayos 1 a 5)*

- Los gránulos de YBCA5 se prepararon mediante fermentación de la levadura durante 3 días en un biorreactor de 10 l (Labfors) usando medios líquidos estériles (4 % de melaza y 1,2 g/l de urea). El fermentado se centrifugó en una centrifugadora (Sorvall RC-5C) a 5000 rpm durante 15 min (rotor n.º SLC-4000, código de rotor 33) para lograr un
- 35 sedimento húmedo de concentrado celular después de descartar el sobrenadante. Ese sedimento húmedo se mezcló con aproximadamente un 30 % (p/p) de almidón de maíz para formar una consistencia de masa rígida y esta se extruyó a través de una malla de acero (tamaño de orificio de 3 mm) y se secó en una campana de flujo laminar durante la noche (20-25 °C) para formar gránulos secados.

- 40 Los tratamientos de YBCA5 se prepararon a partir de estos gránulos dispersables en agua que se habían almacenado a 5-7 °C en un refrigerador y se preparó una suspensión añadiendo 1 g por litro de agua desionizada (concentración final = 2×10^7 UFC/ml) y se agitó suavemente para formar una suspensión. Para garantizar que todas las células se dispersaron uniformemente y permanecieron en suspensión, se añadió un agente humectante (Nu-Film) a 0,5 ml por litro.

45 *Fungicidas (Ensayos 1 a 5)*

- Para los ensayos 1 y 2, se preparó una suspensión líquida que contenía 500 g/l a la tasa de campo recomendada de 0,85 ml/l (un promedio de las tasas de campo recomendadas de 0,75 ml/l para *Monilinia* en fruta de hueso y 1,0 ml/l para *Botrytis* en bayas). No se usó agente humectante.
- 50

- Para los ensayos 3 y 4, se preparó una suspensión líquida de captan a partir de Captan Flo (Nufarm NZ) (que contiene captan a 600 g/l) a la tasa de campo recomendada para su uso en fruta de hueso de 160 ml/litro. No se usó humectante.
- 55

Preparación de inóculo de Monilinia (Ensayos 1 y 3)

- Un cultivo de *Monilinia fructicola* (código aislado MFGQ3), que se había aislado originalmente de un melocotonero infectado ubicado en la región de Hamilton durante 1998, se utilizó para los ensayos de inoculación por pulverización incluidos en esta sección (ensayo basado en Ruakura). El inóculo de *Monilinia* se preparó cultivando esta cepa de
- 60 *Monilinia* durante 7 días en medio PDA (Difco, Fort Richard) y recogiendo las conidias lavando la placa con SDW más Tween 80 (0,05 %) para preparar una suspensión madre de inóculo. A continuación, esta suspensión madre se filtró usando un filtro de células de 70 µm (para eliminar los fragmentos de micelio), la concentración se determinó usando un hemocitómetro y luego se ajustó, por dilución con SDW + Tw 80 (0,05 %) hasta una concentración final de 1×10^4 conidios/ml.
- 65

Preparación de inóculo de Botrytis spp. (ensayo 2 y 4)

Un cultivo de *Botrytis* spp. (código aislado 09-2), que se había aislado originalmente de un kiwi infectado ubicado en la región de Bay of Plenty durante la década de 2000, se utilizó para los ensayos de inoculación por pulverización incluidos en esta sección realizados en cerezas. El inóculo de *Botrytis* spp. se preparó cultivando esta cepa de *Botrytis* spp. durante 5 - 7 días en medio PDA (DIFCO, Fort Richard) y recogiendo los conidios lavando la placa con SDW más Tween 80 (0,05 %) para preparar una suspensión madre de inóculo. A continuación, esta suspensión madre se filtró usando un filtro de células de 70 µm (malla de 70 µm) para eliminar los fragmentos de micelio, la concentración se determinó usando un hemocitómetro y luego se ajustó, por dilución con SDW + Tw 80 (0,01 % v/v) hasta una concentración final de 1×10^5 conidios/ml.

Preparación de inóculo de Botrytis (Ensayo 5)

Dos cultivos de *Botrytis* spp. (códigos de aislamiento 189 y 547), que se habían aislado originalmente de tomates infectados, región de Auckland durante 2010, se utilizaron para los ensayos de inoculación de gotas incluidos en este ensayo. Un aislado fue sensible a dos fungicidas de uso común (dicarboximida y carbendazima) y el otro aislado fue resistente a cada uno de estos mismos fungicidas.

El inóculo de *Botrytis* spp. se preparó cultivando cada aislado de *Botrytis* spp. durante 5 - 7 días en medio PDA (DIFCO, Fort Richard) y recogiendo los conidios lavando la placa con SDW más Tween 80 (0,01 %) para preparar una suspensión madre de inóculo. A continuación, esta suspensión madre se filtró usando un filtro celular (malla de 70 µm, Falcon) para eliminar los fragmentos de micelio, la concentración se determinó usando un hemocitómetro y se ajustó a la concentración requerida (2×10^4 conidios/ml) equivalente a 200 conidios en cada gota de 10 µl. Para garantizar que la suspensión de conidios permaneciera en la superficie de la baya con heridas, se crearon 'copos de cera' de parafina alrededor de la superficie de la herida untando una capa de cera de parafina de 1-2 mm de espesor sobre un portaobjetos de vidrio frotando ligeramente la base de una punta de pipeta de 1 ml sobre la capa de cera de parafina y luego transfiriendo este "anillo de cera de parafina" sobre la superficie de la herida. Esto creó efectivamente un anillo de cera de parafina de 5-6 mm de diámetro ("bund") que retuvo la suspensión de conidios y evitó que se deslizara fuera de la superficie redondeada de la baya. A continuación, las bayas con heridas y tratadas se inocularon con gotas de 10 µl de suspensión de conidios de *Botrytis* spp.

Después de la inoculación del patógeno, todas las muestras de frutas inoculadas en una bandeja se encerraron en una bolsa de plástico durante 48 horas en la mesa de laboratorio a 23 °C (Ensayos 1-4) o 21 °C (Ensayo 5). Para todos los ensayos de cerezas y bayas, se colocaron dos toallas de papel estériles debajo de las rejillas de plástico, sobre las que descansan las bayas, luego se humedeció con 40 ml de SDW y cada bandeja se encerró en una bolsa de plástico limpia y luego se selló para mantener una humedad relativa alta durante las primeras 72 h. A partir de entonces, se retiraron las bolsas, se plegaron sobre las bandejas (para garantizar que cada extremo de la bandeja estuviera abierto para un flujo de aire adecuado), para permitir que la humedad relativa disminuya durante un período de 15 h (5 pm al final de la tarde a 8 am de la mañana siguiente) después de lo cual se volvieron a sellar. Este proceso de alternar la humedad relativa dentro de las cámaras de incubación se repitió durante la duración del experimento y es un método que se ha demostrado que evita un crecimiento excesivo de micelio. Después de 5 días de incubación, fruta con síntomas típicos de *Monilinia* spp. o *Botrytis* spp. se registraron y eliminaron de cada bandeja de réplica. Las podredumbres se registraron diariamente y la incidencia (%) de podredumbres acumulativas de *Monilinia* spp. o *Botrytis* spp., después de 13 días (Ensayo 1 y 2), 16 días (Ensayo 3 y 4) y 9 días (Ensayo 5). En el ensayo 5, la gravedad de la infección por *Botrytis* spp. se determinó para cada tratamiento marcando visualmente la proporción de la superficie de la baya cubierta por conidióforos de *Botrytis* spp.

Control biológico de YBCA5 de *Colletotrichum* spp. y *Penicillium* spp. en manzanas

Ensayos de manzana 6 y 7

Las manzanas ("Pacific Rose") se obtuvieron de un huerto orgánico en Hawkes Bay y se lavaron con agua corriente del grifo en un cubo de 10 l. A continuación, las manzanas se secaron en una campana de riesgo biológico durante aproximadamente 1,5 h, girándolas después de 45 min y luego se limpiaron con un pañuelo empapado en etanol y se dejaron secar una vez más. A continuación, las manzanas se colocaron sobre toallas de papel humedecidas que recubren el fondo de recipientes de plástico en forma de concha, dos manzanas por recipiente. Hubo 10 réplicas de manzanas para cada tratamiento en los ensayos 6 y 7.

Hubo cinco tratamientos: un control Nil (0,05 % de Tween80), fungicida (0,5 ml/l de Prolific (que contiene 500 g/l de carbendazim)), YBCA5 aplicado a 1×10^7 UFC/ml 24 horas antes del patógeno, YBCA5 aplicado a 1×10^7 UFC/ml 2 horas antes del patógeno y patógeno únicamente (*Colletotrichum* spp. para el ensayo 6 y *Penicillium* spp. para el ensayo 7). Los gránulos de YBCA5 se prepararon mediante fermentación de la levadura durante 3 días en un biorreactor de 10 l (Labfors) usando medios líquidos estériles (4 % de melaza y 1,2 g/l de urea). El fermentado se centrifugó en una centrifugadora (Sorvall RC-5C) a 5000 rpm durante 15 min (rotor n.º SLC-4000, código de rotor 33) para lograr un sedimento húmedo de concentrado celular después de descartar el sobrenadante. Ese sedimento húmedo se mezcló con aproximadamente un 30 % (p/p) de almidón de maíz para formar una consistencia de masa

rígida y esta se extruyó a través de una malla de acero (tamaño de orificio de 3 mm) y se secó en una campana de flujo laminar durante la noche (20-25 °C) para formar gránulos secados.

Los tratamientos de YBCA5 se prepararon a partir de estos gránulos dispersables en agua que se habían almacenado a 5-7 °C en un refrigerador y se preparó una suspensión añadiendo 0,5 g por litro de agua desionizada (concentración final = 1×10^7 UFC/ml) y se agitó suavemente para formar una suspensión.

Las suspensiones de esporas de patógenos se prepararon a partir de cultivos de *Colletotrichum* spp. y *Penicillium* spp. cultivados en PDA. Se retiró un tercio del cultivo de la placa Petri de PDA y se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml que contenía 30 ml de SDW (con Tween80 al 0,05 %). Esto se agitó vigorosamente durante 1 min para desalojar las esporas en la suspensión y luego se pasó a través de un filtro de células de 70 μ para eliminar cualquier fragmento de micelio. La concentración de esporas se calculó con la ayuda de un hemocitómetro y se realizaron diluciones para lograr una concentración final de 1×10^5 esporas/ml.

El día que se lavaron y prepararon las manzanas (día 1), se hizo una pequeña herida (3 mm de diámetro $\times$ 2-3 mm de profundidad) en el lateral de cada manzana y se numeró como tratamiento 3. Una alícuota de 10 μ l de suspensión de YBCA5 se añadió a la herida, suficiente para rellenar la herida. Al día siguiente (día 2) se hicieron cuatro heridas más y se numeraron como tratamientos 1, 2, 4 y 5. Los tratamientos 1, 2 y 4 se aplicaron a las heridas añadiendo alícuotas de 10 μ l de cada solución a las heridas respectivas. Dos horas más tarde, se aplicó el patógeno añadiendo alícuotas de 10 μ l de *Colletotrichum* spp. a cada herida (tratamientos 2, 3, 4 y 5) para el ensayo 6 y añadir alícuotas de 10 μ l de *Penicillium* spp. a cada herida (tratamientos 2, 3, 4 y 5) para el ensayo 7. Se añadieron treinta ml de SDW adicional a la toalla de papel en cada recipiente en forma de concha para mantener la humedad relativa y los recipientes se incubaron en una incubadora Sanyo a 23 °C durante 1-2 semanas para permitir que se desarrollaran las podredumbres.

El diámetro de la lesión de las podredumbres se midió usando calibradores digitales después de 8 días. El tamaño de la lesión se corrigió para el diámetro de la herida restando 3 mm de cada medición y luego se llevó a cabo ANOVA usando Genstat para probar las diferencias de tratamiento basándose en las diferencias menos significativas.

Diseño experimental

Los ensayos con cereza (ensayos 1-4) consistieron en 10 cerezas por réplica y hubo seis réplicas (ensayos 1 y 2) y ocho réplicas (ensayos 3 y 4) para cada tratamiento en un diseño de bloques aleatorizado.

El ensayo con bayas de uva (ensayo 5) consistió en cinco bayas por réplica y hubo cuatro réplicas para cada tratamiento en un diseño de bloques aleatorizado.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando GenStat, 13ª edición, con un diseño experimental de bloques al azar y análisis de varianza. La infección de fruta promedio (% de incidencia) se transformó logarítmicamente para igualar la varianza para cumplir mejor con las suposiciones de normalidad del análisis. Se presentan las medias de datos sin procesar y las diferencias menos significativas (LSD), sin embargo, todas las comparaciones estadísticas se basan en el análisis logarítmico.

Resultados de los ensayos de inoculación de cerezas

Ensayo 1

La figura 9 resume el efecto de YBCA5 contra podredumbre de fruta de *Monilinia* en cerezas. La incidencia de podredumbre de fruta de *Monilinia* en el tratamiento Nil fue del 50 % y, aunque los tratamientos con YBCA5 (34 %) e iprodiona (22 %) tuvieron una menor incidencia de *Monilinia*, estas no fueron reducciones significativas en comparación con el tratamiento Nil (Figura 9).

Ensayo 2

La figura 10 resume el efecto de YBCA5 contra la podredumbre de fruta de *Botrytis* spp. en cerezas. La incidencia de podredumbre de fruta de *Botrytis* spp. en el tratamiento Nil fue del 35 % y esto no se redujo significativamente ($P > 0,05$) en el tratamiento con YBCA5 (24 %) e iprodiona (22 %) (Figura 10).

Ensayo 3

La figura 11 resume el efecto de YBCA5 contra podredumbre de fruta de *Monilinia* en cerezas en otro ensayo (Ensayo 3). La incidencia de podredumbre de fruta de *Monilinia* en el tratamiento Nil fue del 88 % y esto no se redujo significativamente ($P > 0,05$) por la YBCA5 (59 %). El tratamiento con fungicida de captan (12 %) redujo significativamente ($P < 0,001$) la incidencia de podredumbre de fruta de *Monilinia* en comparación con el tratamiento Nil (Figura 11).

Ensayo 4

- 5 La figura 12 resume el efecto de YBCA5 contra podredumbre de fruta de *Botrytis* spp. en cerezas en otro ensayo. La incidencia de podredumbre de fruta de *Botrytis* spp. en el tratamiento Nil fue del 67 % y esto no se redujo significativamente ($P>0,05$) en el tratamiento de YBCA5 (49 %) y captan (43 %) (Figura 12).

Resultados del ensayo de inoculación de uva

10 Ensayo 5

- 15 La figura 13 resume el efecto de YBCA5 contra podredumbre de fruta de *Botrytis* spp. en uvas de mesa en otro ensayo (Ensayo 5). La incidencia de podredumbre de fruta de *Botrytis* spp. en el tratamiento Nil fue del 30 % y esto se redujo significativamente ($P<0,001$) por el tratamiento con YBCA5 (7 %) y captan (10 %) (Figura 13).

Tratamiento de otras enfermedades - Resultados de manzana para los Ensayos de manzana 6 y 7

Ensayo 6

- 20 El tamaño medio de la lesión en el control de *Colletotrichum* no tratado fue de 10,1 mm y esto se redujo significativamente ($P<0,05$) en el tratamiento con fungicida y en ambos tratamientos con YBCA5 (Tabla 3).

- 25 La aplicación de YBCA5 24 horas antes del patógeno proporcionó una mejor protección que la aplicación 2 horas antes del patógeno.

Tabla 3. Tamaño de lesión promedio en manzanas ("Pacific Rose") con heridas tratadas con fungicida y YBCA5 antes de la inoculación con esporas de *Colletotrichum* spp. (1×10^5 esporas/ml) y se evaluó después de 8 días de incubación a 23 °C.

Tratamiento	Lesión promedio (día 8)	Significancia
Nil (sin <i>Colletotrichum</i>)	0,3	d
Fungicida (Prolific)	1,1	cd
YBCA5 (24 h)	2,2	c
YBCA5 (2 h)	5,7	b
Nil + <i>Colletotrichum</i>	10,1	a
LSD (5 %)	1,42	
Valor de P	<0,001	

- 30 Las medias de tratamiento seguidas de letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Ensayo 7:

- 35 El tamaño medio de la lesión en el control de *Penicillium* no tratado fue de 15,2 mm y esto se redujo significativamente ($P<0,05$) en el tratamiento con fungicida y en ambos tratamientos con YBCA5 (Tabla 4). De manera similar al ensayo anterior, la aplicación de YBCA5 24 h antes del patógeno proporcionó una protección significativamente mejor que la aplicación de YBCA5 2 h antes del patógeno.

Tabla 4. Tamaño de lesión promedio en manzanas ("Pacific Rose") con heridas tratadas con fungicida y YBCA5 antes de la inoculación con esporas de *Penicillium* spp. (1×10^5 esporas/ml) y se evaluó después de 8 días de incubación a 23 °C.

Tratamiento	Lesión promedio	Significancia
Nil (sin <i>Penicillium</i>)	0,3	c
Fungicida (Prolific)	0,4	c
YBCA5 24 h	0,4	c
YBCA5 2 h	3,8	b
Nil + <i>Penicillium</i>	15,2	a
LSD (5 %)	3,51	
Valor de P	<0,001	

5 Las medias de tratamiento seguidas de letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Ensayo 8: Podredumbre poscosecha debida a hongos fitopatógenos en kiwi "Hongyang"

10 El cultivar de exportación más importante de China es "Hongyang" y este cultivar de pulpa roja y amarilla es atacado por una variedad de patógenos poscosecha que incluyen *Penicillium* spp., *Phomopsis* spp., *Alternaria* spp., *Colletotrichum* spp., *Cryptosporiopsis* spp. y *Botrytis* spp.

15 Investigamos la eficacia de YBCA5 aplicado como protector de heridas contra una variedad de patógenos fúngicos poscosecha de frutas, particularmente: *Penicillium* spp., *Phomopsis* spp., *Alternaria* spp., *Colletotrichum* spp., *Cryptosporiopsis* spp. y *Botrytis* spp.

Se llevaron a cabo pruebas preliminares para establecer la concentración de cada patógeno que se requería para pudrir la fruta después de hierla en ausencia de cualquier tratamiento.

20 *Métodos*

25 Los ensayos de cribado basados en kiwi "Hongyang" (ensayos 8 y 9) se realizaron en laboratorios en el Centro de Investigación Ruakura de Investigación de Plantas y Alimentos, Hamilton, Nueva Zelanda (PFR). Los ensayos de PFR se centraron en la aplicación de heridas del tratamiento YBCA5, se utilizó un tratamiento de control biológico comercial y un fungicida como controles comparativos.

Material de fruto (Ensayos 8)

30 Los kiwis "Hongyang" se obtuvieron del huerto de investigación PFR Riwaka en Motueka el 12 de abril de 2017 para los ensayos basados en frutas 8 y 9. Se llevaron a cabo ensayos de inoculación de *Penicillium* spp., *Phomopsis* spp., *Alternaria* spp., *Colletotrichum* spp., *Cryptosporiopsis* spp. y *Botrytis* spp. en kiwi "Hongyang" que se recogieron en la fase madura de cosecha.

35 Después de sacarlos de la cámara frigorífica a 1 °C, cada fruto se sometió a un proceso de triple lavado. El lavado uno consistió en 30 segundos en etanol al 70 %, luego un lavado en agua del grifo durante 10 minutos en un agitador rotatorio (80 rpm - Lavado 2) seguido de un lavado final durante cinco minutos en SDW - Lavado 3). Todas las frutas se colocaron sobre rejillas de plástico negro estériles en una bandeja de carne de plástico estéril con dos toallas de papel estériles y se dejaron secar durante la noche en una campana de flujo laminar.

40 Justo antes del tratamiento de la herida, cada fruto se hirió en el lateral con una punta de acero inoxidable estéril (4 mm de profundidad $\times$ 3 mm de anchura) y se pipetearon 10 μ l de cada suspensión de tratamiento en la herida y se dejó secar.

Los tratamientos y las tasas se detallan a continuación.

45

Tratamiento	Tasa recomendada	g o ml / litro
YBCA5*	1×10^7	0,5 g/l
Serenade Opti*	125 g/100 l	1,25 g/l
Rovral Aquaflo	75 ml/100 l	0,75 ml/l

* YBCA5 y Serenade Opti se prepararon en Tween 80 (0,05 %), Rovral Aquaflo se preparó en agua desionizada.

50 Para los ensayos 8 y 9, se colocaron dos toallas de papel estériles debajo de los recortes de Plix, se humedecieron con 40 ml de SDW y cada fruta se colocó en fiambresas desechables (Plix Extra Deep 45/45, que contenían cinco recortes de fruta Plix para evitar que la fruta se mueva), se sellaron, luego se colocaron en recipientes de plástico grandes (40 l) que se cerraron para garantizar una alta humedad relativa durante las primeras 24 h y se incubaron en la mesa de laboratorio a 24 °C. Después de 24 h, las fiambresas Plix se retiraron de los recipientes y se pipeteó una

suspensión de 10 ul de cada patógeno fúngico en las heridas tratadas. Todas las fiambreras se volvieron a sellar y se colocaron de nuevo en los recipientes de plástico grandes para garantizar una humedad relativa alta durante las siguientes 48 h. Después de este tiempo, las fiambreras Plix se retiraron de los recipientes de plástico grandes y se colocó un pasador entre la tapa y la base de la caja Plix para permitir que circule algo de aire y que la humedad relativa disminuya durante un período de 15 h (5 pm al final de la tarde a 8 am a la mañana siguiente) después de lo cual se volvieron a sellar. Este proceso de alternar la humedad relativa dentro de las cámaras de incubación se repitió durante la duración del experimento y es un método que se ha demostrado que evita un crecimiento excesivo de micelio. Después de 6 días, (*Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., *Phomopsis* spp., *Colletotrichum* spp.) y 7 días (*Cryptosporiopsis* spp.), la gravedad de la podredumbre fúngica se evaluó para cada tratamiento midiendo la longitud de la lesión (mm) a lo largo del eje de la fruta. Los datos se expresaron como la longitud promedio de la lesión, menos la anchura inicial de la herida (3 mm).

Preparación de YBCA5 (ensayo 8 y 9)

Los gránulos de YBCA5 se prepararon mediante fermentación de la levadura durante 3 días en un biorreactor de 10 l (Labfors) usando medios líquidos estériles (4 % de melaza y 1,2 g/l de urea). El fermentado se centrifugó en una centrifugadora (Sorvall RC-5C) a 5000 rpm durante 15 min (rotor n.º SLC-4000, código de rotor 33) para lograr un sedimento húmedo de concentrado celular después de descartar el sobrenadante. Ese sedimento húmedo se mezcló con aproximadamente un 30 % (p/p) de almidón de maíz para formar una consistencia de masa rígida y esta se extruyó a través de una malla de acero (tamaño de orificio de 3 mm) y se secó en una campana de flujo laminar durante la noche (20-25 °C) para formar gránulos secados.

Los tratamientos de YBCA5 se prepararon a partir de estos gránulos dispersables en agua que se habían almacenado a 5-7 °C en un refrigerador y se preparó una suspensión añadiendo 0,5 g por litro de agua desionizada (concentración final = 1×10^7 UFC/ml) y se agitó suavemente para formar una suspensión.

Preparación de patógenos poscosecha

Preparación de inóculo de *Alternaria* spp. (ensayo 8)

El cultivo de *Alternaria* spp. (código de aislado = "Alternaria ex cherry"), que se había aislado originalmente de un fruto de cereza infectado de Central Otago durante 2016, se usó para la parte de inoculación de heridas de este ensayo. El inóculo de *Alternaria* spp. se preparó cultivando esta cepa de *Alternaria* spp. durante 21 días en medio de agar de harina de avena y recogiendo los conidios lavando la placa con SDW más Tween 80 (0,05 %) para preparar una suspensión madre de inóculo. A continuación, esta suspensión madre se filtró usando un filtro de células de 70 µm (para eliminar los fragmentos de micelio), la concentración se determinó usando un hemocitómetro y luego se ajustó, por dilución con SDW + Tw 80 (0,05 %) hasta una concentración final de 2×10^4 conidios/ml.

Preparación de inóculo de *Botrytis* spp. (ensayo 8)

Un cultivo de *Botrytis* spp. (código aislado 09-2), que se había aislado originalmente de un kiwi infectado ubicado en la región de Bay of Plenty durante la década de 2000, se utilizó para los ensayos de inoculación por pulverización incluidos en esta sección realizados en cerezas. El inóculo de *Botrytis* spp. se preparó cultivando esta cepa de *Botrytis* spp. durante 12 días en medio de agar de harina de avena y recogiendo los conidios lavando la placa con SDW más Tween 80 (0,05 %) para preparar una suspensión madre de inóculo. A continuación, esta suspensión madre se filtró usando un filtro celular de 70 µm (malla de 70 µm) para eliminar los fragmentos de micelio, la concentración se determinó usando un hemocitómetro y luego se ajustó, por dilución con SDW + Tw 80 (0,01 % v/v) hasta una concentración final de 1×10^5 conidios/ml.

Preparación de inóculo de *Colletotrichum* spp. (ensayo 8)

El cultivo de *Colletotrichum* spp. (código de aislado = 'ex G3), que se había aislado originalmente de un kiwi Gold3 infectado del huerto de investigación de Ruakura durante 2017, se usó para la parte de inoculación de heridas de este ensayo. El inóculo de *Colletotrichum* spp. se preparó cultivando esta cepa de *Colletotrichum* spp. durante 21 días en medio PDA (Difco, Fort Richard) y recogiendo los conidios lavando la placa con SDW más Tween 80 (0,05 %) para preparar una suspensión madre de inóculo. A continuación, esta suspensión madre se filtró usando un filtro de células de 70 µm (para eliminar los fragmentos de micelio), la concentración se determinó usando un hemocitómetro y luego se ajustó, por dilución con SDW + Tw 80 (0,05 %) hasta una concentración final de 2×10^4 conidios/ml.

Preparación de inóculo de *Penicillium* spp. (ensayo 8)

El cultivo de *Penicillium* spp. (código de aislado = "*Penicillium* ex limón"), que se había aislado originalmente de una fruta de limón infectada de un supermercado en 2017, se usó para la parte de inoculación de heridas de este ensayo. El inóculo de *Penicillium* spp. se preparó cultivando esta cepa de *Penicillium* spp. durante 12 días en medio PDA (Difco, Fort Richard) y recogiendo los conidios lavando la placa con SDW más Tween 80 (0,05 %) para preparar una suspensión madre de inóculo. A continuación, esta suspensión madre se filtró usando un filtro de células de 70 µm

(para eliminar los fragmentos de micelio), la concentración se determinó usando un hemocitómetro y luego se ajustó, por dilución con SDW + Tw 80 (0,05 %) hasta una concentración final de 2×10^4 conidios/ml.

Preparación de inóculo de *Phomopsis* spp. (ensayo 8)

El cultivo de *Phomopsis* spp. (código de aislado = "*Phomopsis* ex G3"), que se había aislado originalmente de un kiwi Gold3 infectado del huerto de investigación de Ruakura durante 2017, se usó para la parte de inoculación de heridas de este ensayo. El inóculo de *Phomopsis* spp. se preparó cultivando esta cepa de *Phomopsis* spp. durante 21 días en medio PDA (Difco, Fort Richard) y recogiendo los conidios lavando la placa con SDW más Tween 80 (0,05 %) para preparar una suspensión madre de inóculo. A continuación, esta suspensión madre se filtró usando un filtro de células de 70 μ m (para eliminar los fragmentos de micelio), la concentración se determinó usando un hemocitómetro y luego se ajustó, por dilución con SDW + Tw 80 (0,05 %) hasta una concentración final de 2×10^4 conidios/ml.

Preparación de inóculo de *Cryptosporiopsis* spp. (solo ensayo 9)

El cultivo de *Cryptosporiopsis* spp. (código de aislado = "*Cryptosporiopsis* ex G3"), que se había aislado originalmente de un kiwi Gold3 infectado del huerto de investigación Te Puke se usó para la inoculación de heridas en el ensayo 9. El inóculo de *Cryptosporiopsis* spp. se preparó cultivando esta cepa de *Cryptosporiopsis* spp. durante 28 días en medio PDA (Difco, Fort Richard) y recogiendo los conidios lavando la placa con SDW más Tween 80 (0,05 %) para preparar una suspensión madre de inóculo. A continuación, esta suspensión madre se filtró usando un filtro de células de 70 μ m (para eliminar los fragmentos de micelio), la concentración se determinó usando un hemocitómetro y luego se ajustó, por dilución con SDW + Tw 80 (0,05 %) hasta una concentración final de 2×10^4 conidios/ml.

Después de la inoculación de patógenos en los ensayos 8 y 9, todas las muestras de fruta inoculadas se colocaron en fiambrras desechables (Plix Extra Deep 45/45), que contenían cinco recortes de fruta Plix para evitar que la fruta se moviera), y se agregaron 40 ml de SDW a dos toallas de papel estériles que se colocaron debajo de los recortes Plix, luego se colocaron en recipientes de plástico grandes (40 l) que se cerraron para garantizar una humedad relativa alta durante las primeras 48 h y se incubaron en la mesa de laboratorio con luz natural y fluorescente a 24 °C durante hasta tres días. Después de 48 h, las fiambrras Plix se retiraron de los recipientes y se colocó un pasador entre la tapa y la base para permitir que el aire circule y la humedad relativa disminuya durante un período de 15 h (5 pm al final de la tarde a 8 am de la mañana siguiente) después de lo cual se volvieron a sellar. Este proceso de alternar la humedad relativa dentro de las cámaras de incubación se repitió durante la duración del experimento y es un método que se ha demostrado que evita un crecimiento excesivo de micelio. Después de 6 a 7 días, se evaluó la gravedad de la infección por podredumbre fúngica para cada tratamiento midiendo la longitud de la lesión (mm) a lo largo del eje del fruto. Los datos se expresaron como la longitud promedio de la lesión, menos la anchura inicial de la herida (3 mm).

Diseño experimental

El ensayo 8 de kiwi "Hongyang" consistió en 4 kiwis "Hongyang" por réplica y hubo cinco réplicas para cada tratamiento en un diseño de bloques aleatorizado. En total hubo 22 tratamientos, incluyendo un control Nil (sin herida y sin tratamiento) sin inoculación de patógenos), y un control Nil (más herida y luego SDW+Tw80) sin inoculación de patógenos.

En el ensayo 9

El ensayo 9 de kiwi "Hongyang" consistió en 4 kiwis "Hongyang" por réplica y hubo cuatro réplicas para cada tratamiento en un diseño de bloques aleatorizado. En total hubo 5 tratamientos, incluyendo un control Nil (sin herida y sin tratamiento) sin inoculación de patógenos, y un control Nil (más herida y luego SDW+Tw80) sin inoculación de patógenos.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando GenStat, 13ª edición, con un diseño experimental de bloques al azar y análisis de varianza. El diámetro de la lesión promedio no requirió transformación de datos para igualar la varianza y se presentan las medias de datos sin procesar y las diferencias menos significativas (LSD).

Resultados

Ensayo 8

La fruta tratada con YBCA5 tenía lesiones significativamente más pequeñas en la fruta "Hongyang" que los tratamientos con Rovral Aquaflor, Serenade Opti y el control no tratado cuando la fruta se inoculó con *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Penicillium* y *Phomopsis*. La fruta tratada con YBCA5 tenía lesiones no significativamente más pequeñas que Rovral Aquaflor cuando la fruta se inoculó con *Botrytis* spp., pero fueron significativamente más pequeñas que el tratamiento con Serenade Opti y el control sin tratar.

La fruta tratada con Rovral Aquaflo tenía lesiones significativamente más pequeñas que el control no tratado cuando la fruta se inoculó con *Botrytis* spp. y *Penicillium* spp. La fruta tratada con Serenade Opti tenía lesiones significativamente más pequeñas que el control sin tratar cuando la fruta se inoculó con *Phomopsis* (Figura 14).

- 5 En el ensayo 9, la fruta tratada con YBCA5 también tenía lesiones significativamente más pequeñas en la fruta "Hongyang" que los tratamientos con Rovral Aquaflo, Serenade Opti y el control no tratado cuando la fruta se inoculó con *Cryptosporiopsis* (Figura 15).

10 Análisis

YBCA5 demostró actividad contra una variedad de patógenos de fruta de kiwi poscosecha cuando se permitió que colonizara un sitio de herida 24 horas antes de que se introdujera un patógeno en la misma herida. La herida funciona bien como técnica experimental para demostrar la actividad de algunos bioplaguicidas.

- 15 En general, Rovral Aquaflo tuvo un rendimiento deficiente en estos experimentos, y este producto agroquímico puede no ser adecuado para los ensayos de protección de heridas y contra los patógenos utilizados en este estudio.

Serenade Opti tuvo un rendimiento deficiente en estos ensayos, y este biopesticida puede no ser adecuado como protector de heridas de frutos con heridas contra los patógenos usados en estos ensayos.

- 20 EJEMPLO 5 - Control biológico de levadura de PSA en el campo

Sumario

- 25 Tratamiento con estándar del cultivador: Kocide Opti + 1 × Kasumin

1	Producto:	2	Ingrediente activo (IA)
3	Kocide:	4	Hidróxido de cobre
5	Kasumin:	6	Kasugamicina
7	ActiGard:	8	Acibenzolar-S-metilo

- 30 Metodología: todas las plantas tenían una aplicación de cobre en la brotación, el grupo de tratamiento recibió entonces el tratamiento de levadura mientras que los controles no recibieron tratamiento y estándar de cultivador respectivamente.

Pruebas de campo 2015-16

35 Métodos

Se establecieron dos sitios de prueba de campo durante la primavera de 2015 con la intención de ejecutarse en dos temporadas consecutivas. Los dos bloques "Hayward" (Bloque B y C codificados) se ubicaron en huertos separados, cerca de Maketu, Bahía de Plenty. El bloque C era el mismo huerto que la prueba de 2014-15, pero se usó un área diferente en los bloques. Las plantas en todos los bloques se entrenaron en pérgola con una sola planta por bahía. Las plantas generalmente parecían sanas al comienzo de la prueba, pero había sufrido síntomas significativos de Psa 2-3 años antes, de acuerdo con el cultivador.

Los tratamientos por pulverización se aplicaron a plantas individuales (ocho repeticiones por tratamiento) dispuestas en un diseño de bloques aleatorizados. Los tratamientos fueron:

1. Nil - no se aplican productos de control de Psa durante la temporada de crecimiento
2. Estándar de cultivador - programa de pulverización foliar a base de cobre, incluyendo hasta una pulverización de antibiótico
3. YBCA5 - programa de pulverización foliar a base de levadura (2×10^7 UFC/ml)

Las aplicaciones de pulverización en los tratamientos de estándar del cultivador y YBCA5 se aplicaron de acuerdo con el programa en la Tabla 5. Se añadieron adyuvantes agrícolas comunes a las aplicaciones de estándar del cultivador (0,04 % de Du-Wett®) y de YBCA5 (0,03 % de Nu-Film-17®).

Tabla 5. Fechas de aplicación en los Bloques B y C para el tratamiento de estándar del cultivador y YBCA5 a kiwi contra *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) desde la brotación hasta la posfloración durante la temporada 2015-16.

Fecha	Bloque B		Bloque C	
Tratamiento	Estándar del cultivador	YBCA5	Estándar del cultivador	YBCA5
6 de oct. de 2015	Kocide Opti ¹	YBCA5 ²	-	-
7 de oct. de 2015	-	-	Kocide Opti	YBCA5
16 de oct. de 2015	Kasumin ³	YBCA5	Kasumin	YBCA5
27 de oct. de 2015	Kocide Opti	YBCA5	Kocide Opti	YBCA5
4 de nov. de 2015	-	-	Kocide Opti	YBCA5
6 de nov. de 2015	Kocide Opti	YBCA5	-	-
19 de nov. de 2015	Nil (floración)	YBCA5	Nil (floración)	YBCA5
21 de dic. de 2015	Nil (post cuajado)	YBCA5	Nil (post cuajado)	YBCA5

¹ Kocide® Opti™ aplicado a 70 g/100 l con Du-Wett® (0,04 %)
² YBCA5 aplicada a 100 g/100 l con Nu-Film-17® (0,03 %)
³ Kasumin® aplicado a 500 g/100 l (sin adyuvante).

- 5 La levadura YBCA5 se produjo por fermentación líquida, procedente de tres instalaciones de producción separadas: PFR (Ruakura), AgResearch (Lincoln) y Callaghan Innovation (Lower Hutt). Se suministró un sedimento de levadura concentrado después de la centrifugación al laboratorio en Ruakura y éste se mezcló con un portador inerte y se extruyó para formar gránulos que se secaron al aire durante la noche en una campana de flujo laminar. El número de unidades formadoras de colonias/g se calculó disolviendo 0,2 g de muestras en 20 ml de solución salina tamponada con fosfato modificada con Tween 80 al 0,05 % (PBSTw). Esto se diluyó en serie y se transfirieron gotas de 10 µl de cada dilución a placas Petri con agar de extracto de levadura de malta modificado con cloranfenicol. Las placas Petri se incubaron durante 24 h a 25 °C y luego a 4-6 °C durante otras 24 h, antes de contar el número de colonias. La concentración de YBCA5 en los gránulos era $2,1 \times 10^{10}$ UFC/g. Todos los gránulos se almacenaron en recipientes herméticos en un refrigerador (4-6 °C) y se pesaron a una tasa de 100 g/100 l para lograr la concentración de pulverización objetivo de 2×10^7 UFC/ml.

20 Las evaluaciones de la enfermedad de Psa se llevaron a cabo en los bloques "Hayward" justo antes de la floración el 11 de noviembre de 2015 evaluando visualmente las hojas para determinar la gravedad de las manchas por Psa (% de área foliar con necrosis). Las evaluaciones se llevaron a cabo en hojas colocadas entre el segundo y el tercer cable fuera del cordón principal. Las evaluaciones comenzaron después de dar un paso (es decir, 1 m) desde el borde del terreno y se puntuó un conjunto de 25 hojas. Este proceso se repitió después de dar otro paso hacia abajo en el terreno. Esto se repitió a continuación por el otro lado de la planta de modo que se puntuaron cuatro conjuntos de 25 hojas (total = 100) dentro de cada terreno. Asimismo, 100 yemas/terreno se puntuaron para determinar la gravedad del pardeamiento de las yemas, como se ha descrito anteriormente.

25 Los datos se expresaron como incidencia de Psa (basada en la proporción de hojas con manchas por Psa/proporción de yemas con sépalos marrones) y severidad de Psa promedio (% medio de área foliar necrótica/número medio de sépalos marrones en yemas). Los datos se transformaron logarítmicamente y se analizaron mediante ANOVA usando Genstat (ver. 16) para determinar las diferencias de tratamiento. Los datos sin procesar se presentan con diferencias estadísticas indicadas basándose en los datos transformados logarítmicamente. El análisis también se llevó a cabo combinando datos de ambos sitios de huerto, después de comprobar cualquier interacción significativa sitio x tratamiento.

35 Resultados

Los análisis de la incidencia y gravedad de las hojas con manchas foliares (necrosis), y de manera similar para los síntomas de las yemas, indicaron que no hubo una interacción significativa de Tratamiento x Huerto; por lo tanto, los datos se presentan como la media de los dos huertos (Bloques B y C).

40 El control Nil tenía una incidencia media de hojas con necrosis del 50 % y esto se redujo significativamente ($P < 0,05$) por los tratamientos con Kocide Opti y dos con YBCA5 (Tabla 6). La eficacia de la YBCA5 fue del 33 %. El tratamiento de estándar del cultivador (Kocide Opti + Kasumin) tuvo una eficacia del 74 % y dio como resultado una reducción significativa adicional en la incidencia de hojas con necrosis, en comparación con los tratamientos con YBCA5 y Kocide Opti.

45 La gravedad media de las manchas foliares fue solo del 0,24 % en el control Nil (Tabla 6). Sin embargo, todavía hubo una reducción significativa ($P < 0,05$) en la gravedad media de la necrosis foliar en cada uno de los tratamientos, en comparación con el control Nil, incluyendo los dos tratamientos con YBCA5. La eficacia promedio de la YBCA5 fue del 58 %, en comparación con los tratamientos de estándar del cultivador y Kocide Opti que tenían una eficacia del 91 y 73 %, respectivamente.

La incidencia de yemas de flores en el control Nil con sépalos necróticos fue del 61 % y esto se redujo

significativamente ($P<0,05$) por cada uno de los tratamientos (Tabla 6). Los dos tratamientos con YBCA5 tuvieron una incidencia del 39 y 37 % de yemas con necrosis y una eficacia promedio del 38 %. El tratamiento de estándar del cultivador tuvo significativamente ($P<0,05$) menos necrosis de yemas (13 %) en comparación con cada uno de los otros tratamientos (eficacia del 79 %). El tratamiento con Kocide Opti tuvo una eficacia del 40 %.

La gravedad media de la necrosis de las yemas (número de sépalos/yemas necróticos) fue de 1,29 en el control Nil y, de manera similar a la incidencia de yemas con necrosis, esto se redujo significativamente ($P<0,05$) en cada uno de los tratamientos, proporcionando el tratamiento de estándar del cultivador (0,21, eficacia = 84 %) la mayor reducción (Tabla 6). La eficacia promedio de los tratamientos con YBCA5 fue del 46 % y esto fue similar al tratamiento con Kocide Opti (eficacia del 38 %).

Tabla 6. Incidencia media y gravedad de manchas foliares y pardeamiento de las yemas en plantas de *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* "Hayward" en el Bloque B y C después de la aplicación foliar de YBCA5 en comparación con un tratamiento foliar de estándar del cultivador basado en Kasumin® y Kocide® Opti™ y solo Kocide Opti, evaluado el 11 de noviembre de 2015.

Tratamiento	% de hojas con manchas (incidencia)	Severidad de las manchas (% de área foliar)	% yemas con necrosis (incidencia)	Severidad del pardeamiento de las yemas (n.º sépalos)
Control Nil	50 a	0,24 a	61 a	1,29 a
Estándar del cultivador	13c	0,02 b	13c	0,21 c
YBCA5	33 b	0,11 b	39 b	0,68 b
Kocide Opti *	27 b	0,07 b	45 b	0,80 b
YBCA5*	34 b	0,10 b	37 b	0,72 b
LSD	8,0	0,099	9,9	0,226
Valor de P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

El estándar del cultivador es una aplicación de Kasumin® y tres aplicaciones de Kocide® Opti™ aplicado en Du Wett® (0,04 % v/v) YBCA5 es un agente de control biológico del desarrollo formulado aplicado a 100 g/100 l en Nu-Film-17® (0,03 % v/v) Análisis realizado combinando datos de los dos sitios de prueba de huerto

* Tratamiento donde *Trichoderma* se aplicó al suelo a los terrenos 1 día antes de estas evaluaciones de enfermedad
LSD es la diferencia menos significativa ($P<0,05$)

Las medias seguidas por las mismas letras no son significativamente diferentes entre sí ($P<0,05$).

Pruebas de campo 2016-17

Métodos

Durante los meses de invierno, el cultivador aplicó su programa de pulverización de invierno estándar de Kocide Opti y en la primavera se aplicaron los mismos tratamientos que anteriormente a las mismas plantas. Las aplicaciones de pulverización comenzaron cuando el cultivador aplicó Kocide Opti en el bloque de prueba a principios de la brotación (2 de octubre de 2016) y esto fue seguido por el programa descrito en la Tabla 7, con los terrenos de control Nil que no reciben aplicaciones de pulverización. Los tratamientos con *Trichoderma* también continuaron en estas dos pruebas de campo.

Los gránulos de levadura YBCA5 utilizados esta temporada se produjeron como un lote precomercial (YBCA5 e-nema-2) por la empresa de fabricación, e-nema GmbH, por fermentación líquida y secado en lecho fluidizado. Los gránulos de YBCA5 se importaron a Nueva Zelanda el 23 de septiembre de 2016 y se almacenaron en un recipiente hermético a 4-6 °C hasta que se requirieron para la aplicación del tratamiento. Estos gránulos tenían una UFC/g media de 3×10^{10} el 26 de septiembre de 2016 y $2,6 \times 10^{10}$ cuando se probó su viabilidad el 2 de noviembre de 2016.

La tasa de aplicación de YBCA5 esta temporada se estableció en la tasa comercial probable de 50 g/100 l (para lograr una concentración mínima de 1×10^7 UFC/ml) y no se ajustó para la viabilidad real en los gránulos, lo que indica que la dosis de aplicación real osciló entre $1,25-1,5 \times 10^7$ UFC/ml. Las evaluaciones de enfermedades en hojas y yemas se llevaron a cabo como se ha descrito para la temporada anterior (arriba).

Tabla 7. Fechas de aplicación en los Bloques B y C para el tratamiento de estándar del cultivador y YBCA5 a kiwi contra *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) desde la brotación hasta la posfloración durante la temporada 2016-17.

Fecha	Bloque B		Bloque C	
Tratamiento	Estándar del cultivador	YBCA5	Estándar del cultivador	YBCA5
11 de oct. de 2016	Kocide Opti ¹	YBCA5 ²	Kocide Opti	YBCA5
18 de oct. de 2016	Kasumin ³	YBCA5	Kasumin	YBCA5
27 de oct. de 2016	Kocide Opti	YBCA5	Kocide Opti	YBCA5

(continuación)

Fecha	Bloque B		Bloque C	
Tratamiento	Estándar del cultivador	YBCA5	Estándar del cultivador	YBCA5
8 de nov. de 2016	Kocide Opti	YBCA5	Kocide Opti	YBCA5
14 de nov. de 2016	Nil (floración)	YBCA5	Nil (floración)	YBCA5
5 de dic. de 2016	Nil (post cuajado)	YBCA5	Nil (post cuajado)	YBCA5

¹ Kocide® Opti™ aplicado a 70 g/100 l con Du-Wett® (0,04 %)
² YBCA5 aplicado a 50 g/100 l con Bond® Xtra (0,06 %)
³ Kasumin® aplicado a 500 g/100 l (sin adyuvante).

Las evaluaciones de la enfermedad de Psa en las yemas de flores se llevaron a cabo en los bloques "Hayward" justo antes de la floración el 11 de noviembre de 2016 evaluando visualmente 100 yemas/terreno para determinar la gravedad del pardeamiento de las yemas, como se ha descrito anteriormente. Se evaluaron las hojas para determinar la gravedad de las manchas de Psa (% de área foliar con necrosis) en estos terrenos de prueba el 18 de noviembre de 2016. Como se ha descrito anteriormente, las evaluaciones se llevaron a cabo en hojas colocadas entre el segundo y el tercer cable fuera del cordón principal. Las evaluaciones comenzaron después de dar un paso (es decir, 1 m) desde el borde del terreno y se puntuó un conjunto de 25 hojas. Este proceso se repitió después de dar otro paso hacia abajo en el terreno. Esto se repitió a continuación por el otro lado de la planta de modo que se puntuaron cuatro conjuntos de 25 hojas (total = 100) dentro de cada terreno.

Resultados

En el segundo año de esta prueba de campo, la incidencia de manchas foliares fue del 31 % en el control Nil y esto se redujo significativamente en los dos tratamientos con YBCA5 (Tabla 8). La eficacia del tratamiento solo con YBCA fue del 42 %. El tratamiento de estándar del cultivador, que incluía el bactericida Kasumin, proporcionó una reducción adicional significativa en la incidencia de manchas foliares, en comparación con los tratamientos con YBCA5 (eficacia = 74 %).

La gravedad media de las manchas foliares fue del 0,19 % en el control Nil y esto se redujo significativamente en los tratamientos con YBCA5, en comparación con el control Nil (Tabla 8). La eficacia del tratamiento solo con YBCA fue del 53 %. Hubo una reducción adicional en el tratamiento de estándar del cultivador, pero en este caso los tratamientos de estándar del cultivador y YBCA5 no fueron significativamente diferentes entre sí.

En el control Nil, la incidencia de yemas con necrosis fue del 18 % y la gravedad de la necrosis fue de 0,27. Los dos tratamientos con YBCA5 redujeron significativamente la incidencia y severidad de las yemas en comparación con el control Nil (eficacia de YBCA5 sola = 56 y 59 %, respectivamente). Aunque el estándar del cultivador tenía menos enfermedad que los tratamientos con YBCA5, estos no fueron significativamente diferentes.

Tabla 8. Incidencia media y gravedad de manchas foliares y pardeamiento de las yemas en plantas de *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* "Hayward" en el Bloque B y C después de la aplicación de pulverización foliar de YBCA5 en comparación con un tratamiento foliar de estándar del cultivador basado en Kasumin® y Kocide® Opti™ y un tratamiento con *Trichoderma*, evaluado el 11 de noviembre de 2016 (yemas) y el 18 de noviembre de 2016 (hojas).

Tratamiento	% de hojas con manchas (incidencia)	Severidad de las manchas (% de área foliar)	% yemas con necrosis (incidencia)	Severidad del pardeamiento de las yemas (n.º sépalos)
Control Nil	31 a	0,19 a	18 a	0,27 a
Estándar del cultivador	8 c	0,02 c	4 b	0,05 b
YBCA5	18 b	0,09 be	8 b	0,11 b
<i>Trichoderma</i>	29 a	0,17 ab	14 a	0,20 a
YBCA5*	18 b	0,08 be	8 b	0,09 b
LSD	8,4	0,092	5,1	0,085
Valor p	<0,001 **	0,005	<0,001	<0,001

El estándar del cultivador es una aplicación de Kasumin® y tres aplicaciones de Kocide® Opti™ aplicado en Du Wett® (0,04 % v/v) YBCA5 es un agente de control biológico del desarrollo formulado aplicado a 100 g/100 l en Bond® Xtra (0,03 % v/v)

Análisis realizado combinando datos de los dos sitios de prueba de huerto

* Tratamiento con YBCA5 donde *Trichoderma* se había aplicado al suelo de estos terrenos en tres ocasiones durante los 12 meses anteriores

** Hubo una interacción significativa de sitio x tratamiento (P = 0,016) para esta variable, de modo que no hubo efectos de tratamiento significativos en el Bloque C y en el Bloque B hubo un efecto de tratamiento altamente significativo (P<0,001) siendo la diferencia de tratamiento la misma que se indica en este análisis combinado

LSD es la diferencia menos significativa (P<0,05)

Las medias seguidas por las mismas letras no son significativamente diferentes entre sí (P<0,05).

Conclusión:

El tratamiento con YBCA5 mostró reducciones significativas en la incidencia y gravedad de las manchas foliares y el pardeamiento de las yemas en las plantas "Hayward".

5 En esta memoria descriptiva donde se ha hecho referencia a especificaciones de patente, otros documentos externos u otras fuentes de información, esto es generalmente con el fin de proporcionar un contexto para analizar las características de la invención. A menos que se afirme específicamente lo contrario, la referencia a dichos documentos externos no debe interpretarse como una admisión de que dichos documentos, o tales fuentes de información, en
10 cualquier jurisdicción, son técnica anterior, o forman parte del conocimiento general común en la técnica.

Aplicación industrial

15 La cepa YBCA5 de levadura *Aureobasidium pullulans* aislada y las composiciones que comprenden o consisten esencialmente en YBCA5 de la presente invención encuentran un uso en el control de bacterias y hongos fitopatógenos.

REIVINDICACIONES

1. Cepa YBCA5 de levadura *Aureobasidium pullulans* aislada (n.º de acceso de CBS 141880).
- 5 2. Una composición que comprende la cepa YBCA5 de levadura *Aureobasidium pullulans* y un vehículo agrícolamente aceptable.
3. Una composición de la reivindicación 2, en donde YBCA5 está presente en forma de células reproductivamente viables.
- 10 4. La composición de la reivindicación 3, en donde la concentración de células viables de YBCA5 varía de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{14} , preferiblemente de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^{11} , preferiblemente de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^9 , preferiblemente de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 , preferiblemente de aproximadamente 2×10^7 a aproximadamente 2×10^8 UFC, preferiblemente de aproximadamente 2×10^9 a aproximadamente 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 UFC por mililitro para composiciones líquidas, preferiblemente de aproximadamente 2×10^{10} UFC por gramo para composiciones sólidas, y de aproximadamente 2×10^7 UFC por mililitro para composiciones líquidas.
- 15 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprende además al menos un adyuvante agrícolamente aceptable.
- 20 6. Un método de control de bacterias *Pseudomonas* spp. en una planta o parte de la misma, comprendiendo el método poner en contacto la planta o parte de la misma con cepa YBCA5 de levadura *Aureobasidium pullulans*, o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, en donde la al menos una cepa de bacterias *Pseudomonas* spp. es una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en *P. syringae*, *P. amygdalia*, *P. avellanae*, *P. caricapapayae*, *P. cichorii*, *P. coronafaciens*, *P. ficuserectae*, *P. helianthi*, *P. lemmiae*, *P. savastanoi* y *P. viridiflava*, o una patovariedad de las mismas, o combinaciones de las mismas, preferiblemente la al menos una cepa es *P. syringae* o una patovariedad de la misma, más preferiblemente la al menos una cepa es *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa).
- 30 8. El método de las reivindicaciones 6 o 7, en donde la planta o parte de la misma es una planta de importancia agrícola, cultivar de la misma, o producto de la misma seleccionada del grupo que consiste en plantas de importancia agrícola y árboles frutales de importancia agrícola, y cultivares y productos de los mismos, preferiblemente en donde los árboles frutales de importancia agrícola o cultivares de los mismos se seleccionan de olivos, manzanos, perales, árboles frutales cítricos, plataneros, plantas de piña, melocotoneros, albaricoqueros, cerezos, nogales y avellanos y los productos de los mismos son aceitunas, manzanas, peras, frutas cítricas, plátanos, piñas, melocotones, albaricoques, cerezas, nueces y avellanas respectivamente, preferiblemente en donde las plantas de importancia agrícola o cultivares de las mismas se seleccionan de plantas de patata, plantas de remolacha, plantas de frijol, plantas de guisantes, plantas de tomate, plantas de pepino, plantas de melón, plantas de bayas, vides y plantas de kiwi y los productos de los mismos son patatas, remolachas rojas, judías, guisantes, tomates, pepinos, melones, bayas, uvas y kiwis respectivamente, preferiblemente en donde la planta de importancia agrícola es una planta de kiwi o cultivar de la misma, y el producto es kiwi.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en donde la planta de kiwi se selecciona del grupo que consiste en especies de kiwi de pulpa verde (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa*), kiwi dorado (*A. chinensis* var. *chinensis*), grosella espinosa china (*A. coriacea*), kiwi bebé (*A. arguta*), kiwi ártico (*A. kolomikta*), kiwi rojo (*A. melanandra*, *A. chinensis* var. *chinensis*), planta de plata (*A. polygama*) y kiwi morado (*A. purpurea*) o un cultivar de los mismos, preferiblemente en donde los kiwis se seleccionan del grupo que consiste en especies *A. chinensis* var. *deliciosa* y *A. chinensis* var. *chinensis* o un cultivar de las mismas, preferiblemente en donde el kiwi es una especie de *A. chinensis*, preferiblemente en donde el kiwi es *A. chinensis* var. *chinensis* Planch, preferiblemente en donde el cultivar es un cultivar de variedad "Hayward", "Hort16A" o "Hongyang".
- 40 10. El método de la reivindicación 7, en donde la bacteria *Pseudomonas* spp. es *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa).
- 45 11. El método de la reivindicación 9, en donde el kiwi se selecciona del grupo que consiste en especies de *A. chinensis* var. *deliciosa* o *A. chinensis* var. *chinensis*, o un cultivar de las mismas.
- 50 12. Un método para aumentar el rendimiento de una planta de kiwi infectada o susceptible de infección por *Pseudomonas* spp., preferiblemente infectada, preferiblemente susceptible de infección con Psa, comprendiendo el método aplicar la cepa YBCA5 de levadura *Aureobasidium pullulans*, o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 a la planta de kiwi o parte de la misma.
- 55 13. Un método de control de al menos un hongo fitopatógeno en una planta o parte de la misma, comprendiendo el método poner en contacto la planta o parte de la misma con cepa YBCA5 de levadura *Aureobasidium pullulans*, o una

composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.

14. Un método de la reivindicación 13 en donde el hongo fitopatógeno se selecciona del grupo que consiste en hongo
5 *Monilinia* spp., preferiblemente *Monilinia fructicola*; *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., *Penicillium* spp., *Phomopsis* spp.,
Alternaria spp., *Sclerotinia* spp. y *Cryptosporiopsis* spp.

15. Un método para aumentar el rendimiento de una planta de fruta u hortaliza infectada, o susceptible de infección
10 por un hongo fitopatógeno, comprendiendo el método aplicar la cepa YBCA5 de levadura *Aureobasidium pullulans*, o
una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 a la planta de fruta u hortaliza o parte de la misma, y
hacer crecer la planta o parte de la misma.

Figura 1

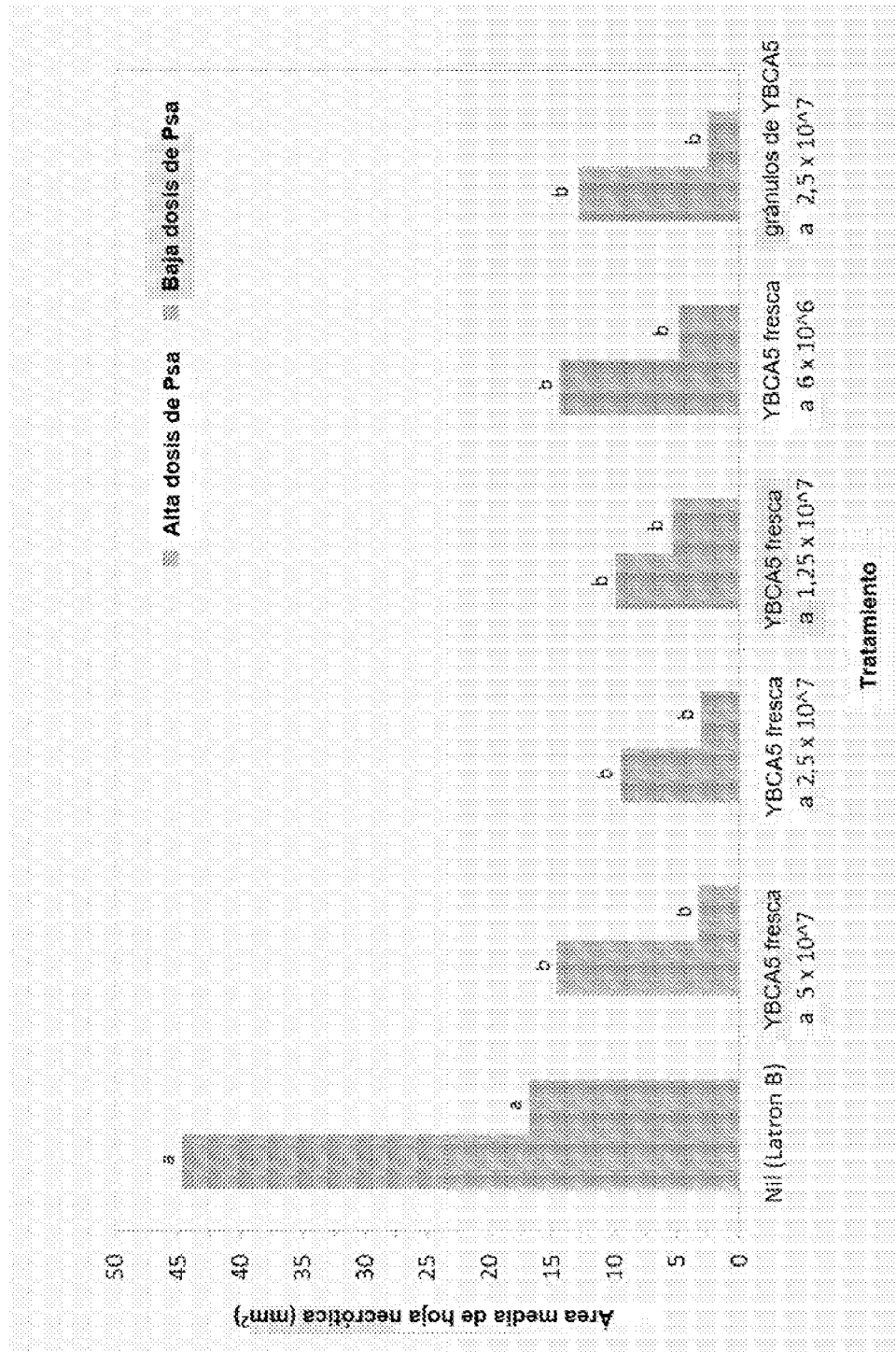


Figura 2

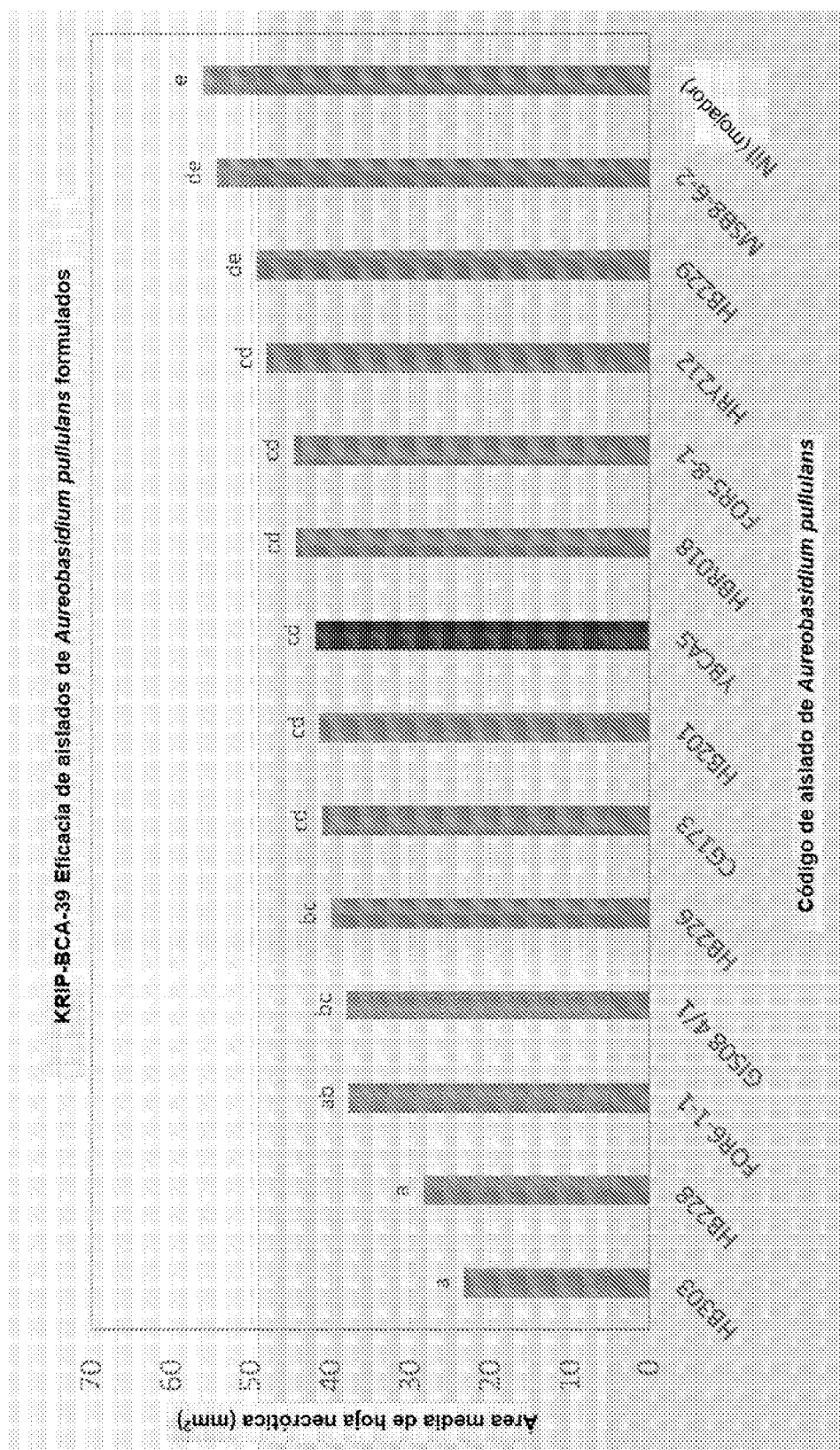


Figura 3

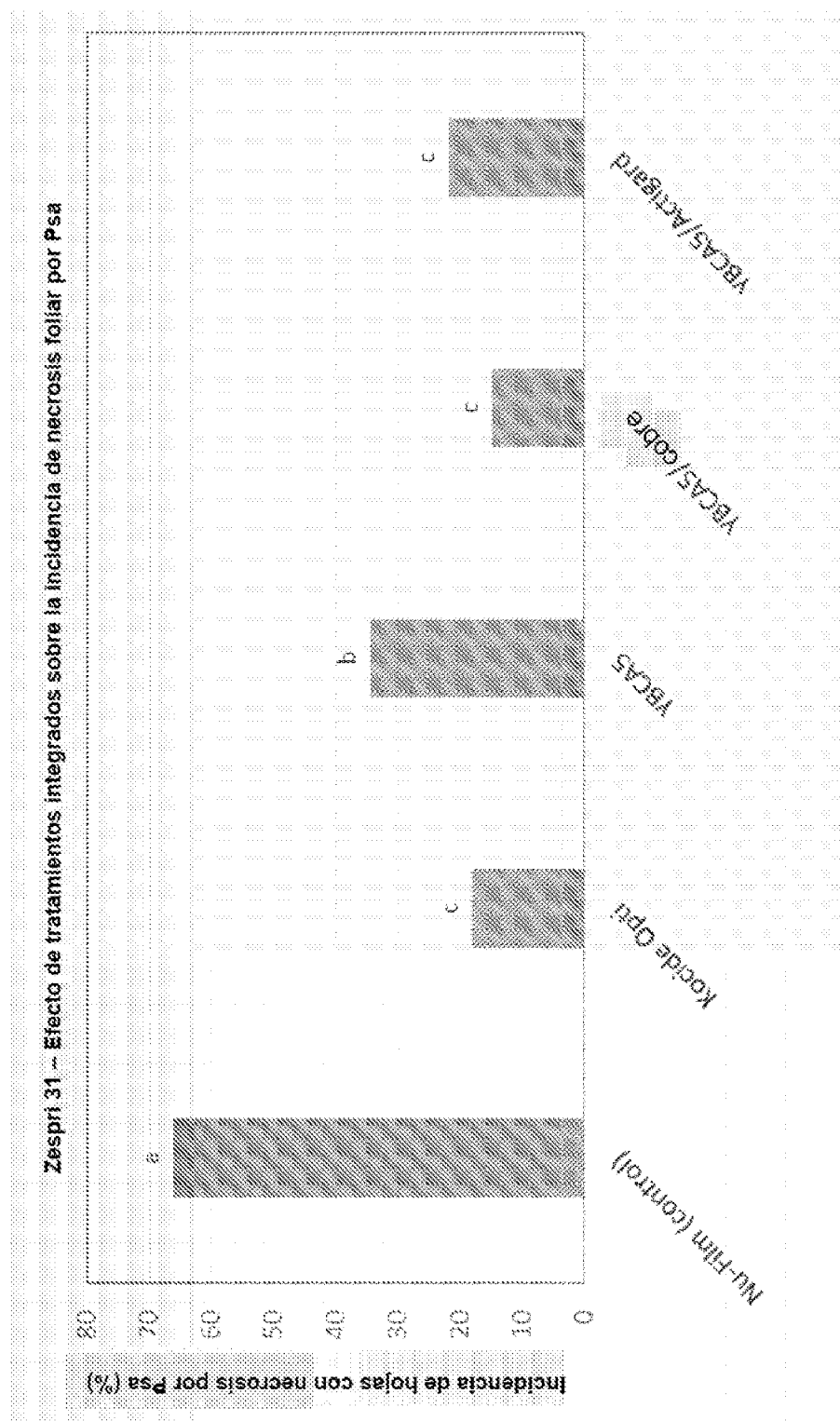


Figura 4

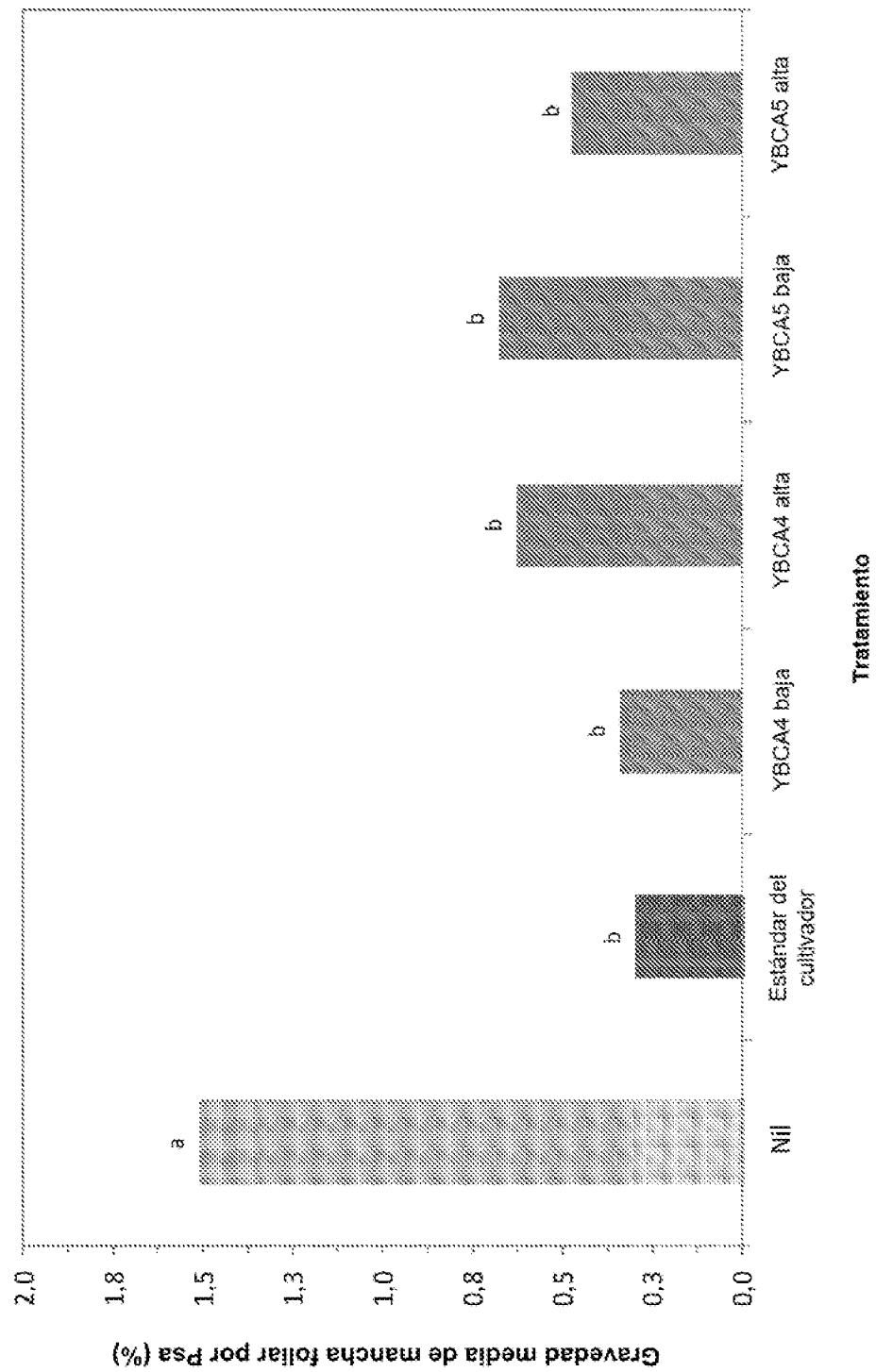


Figura 5

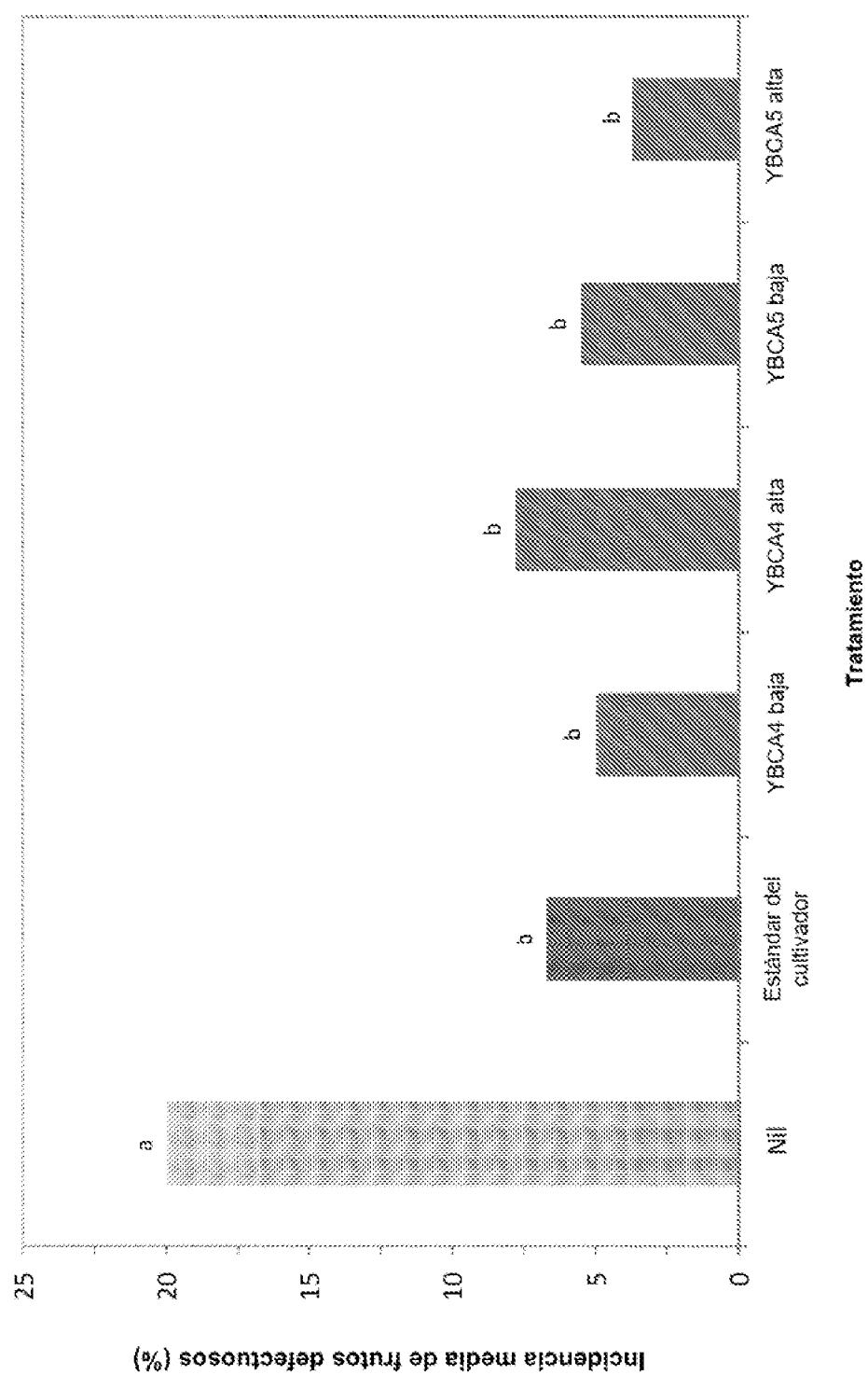


Figura 6

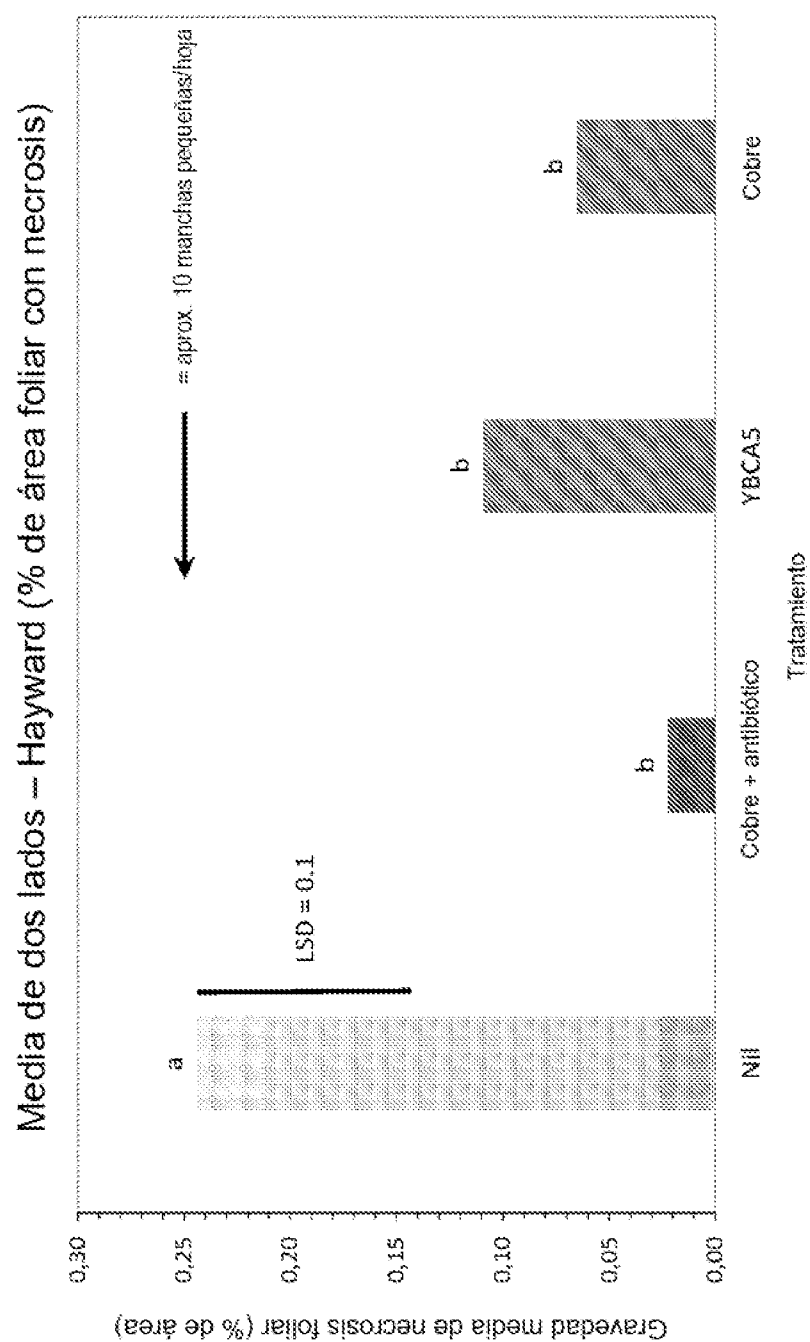


Figura 7

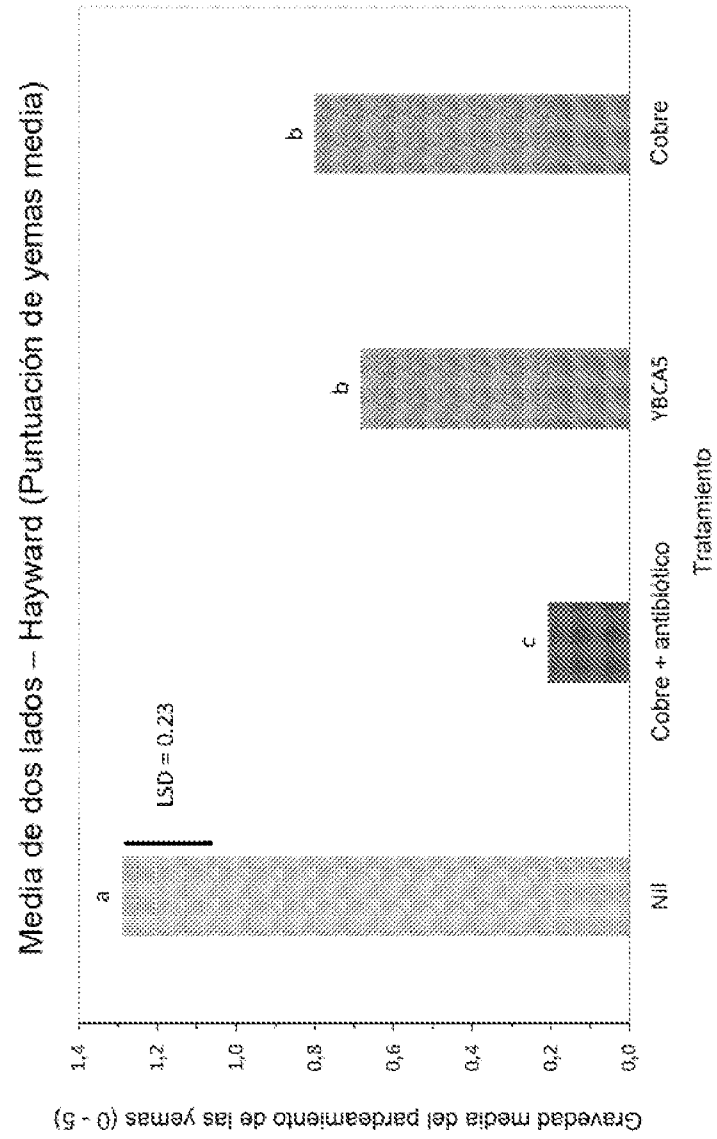


Figura 8

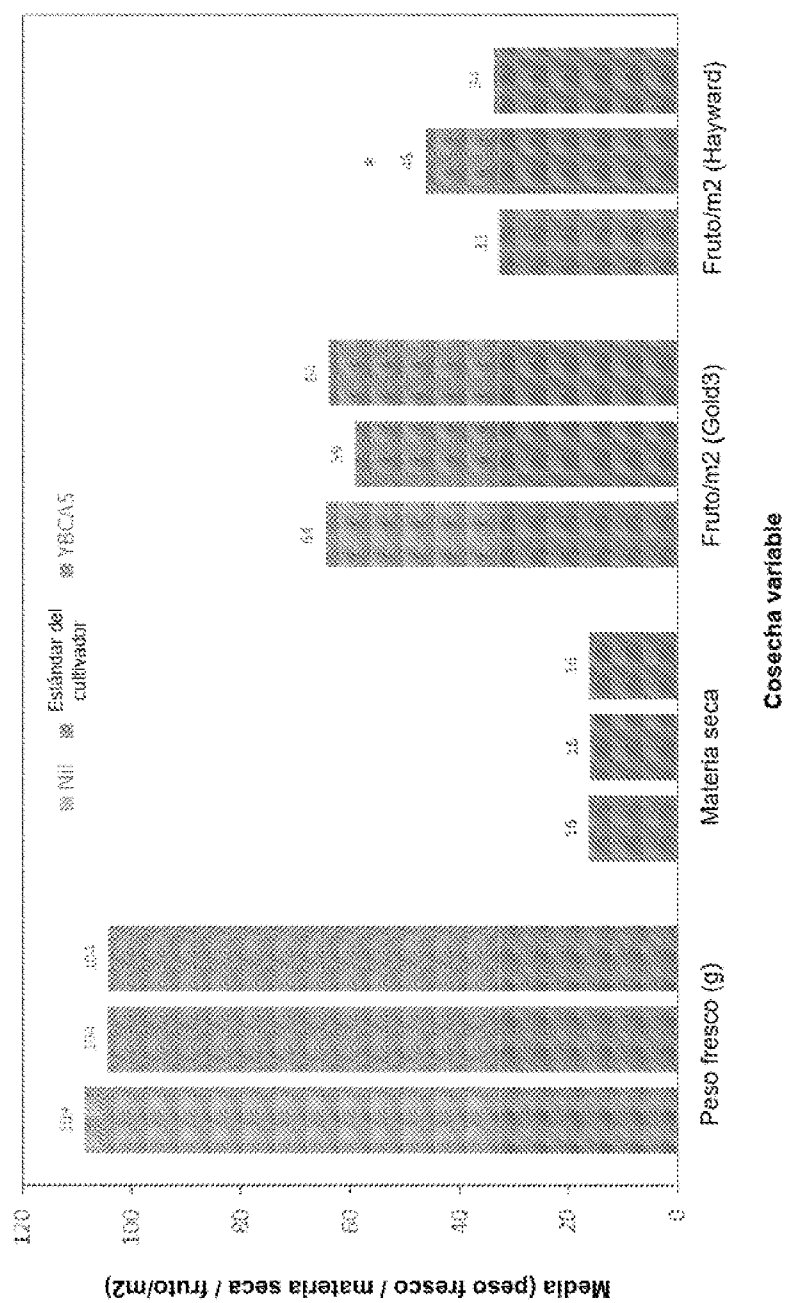


Figura 9

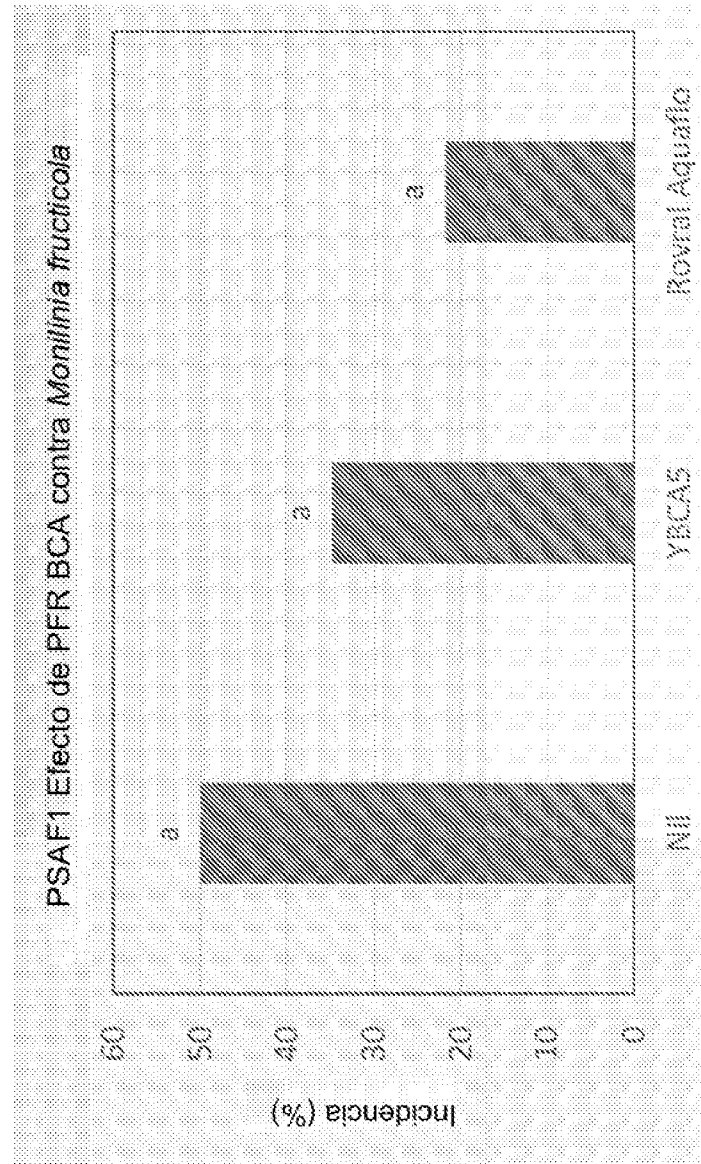


Figura 10

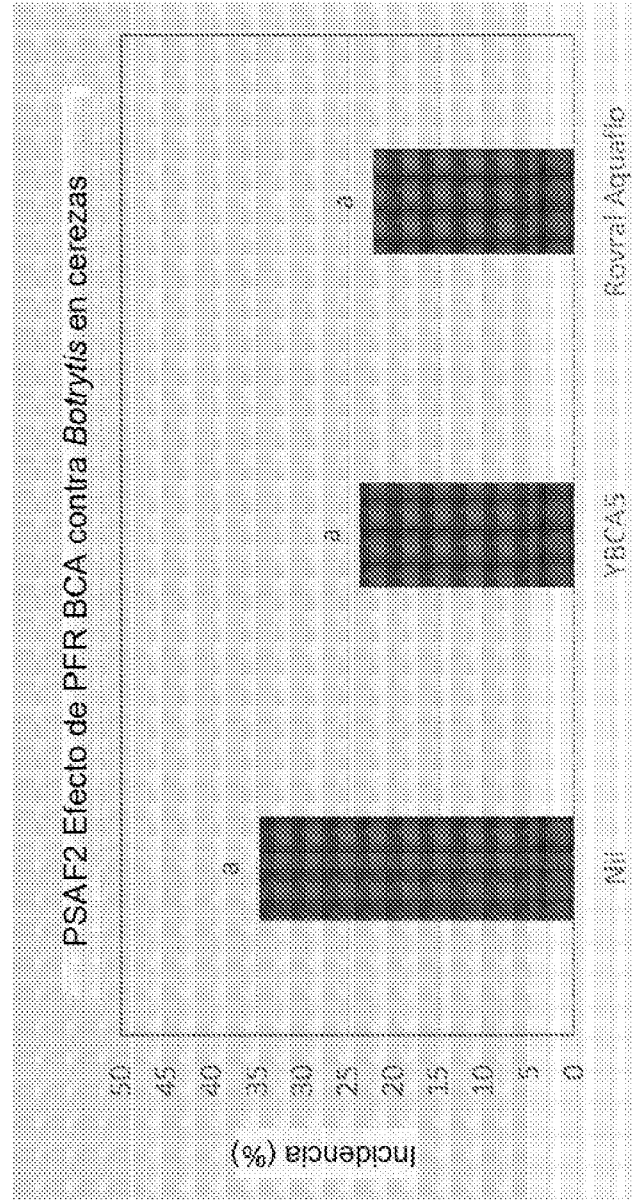


Figura 11

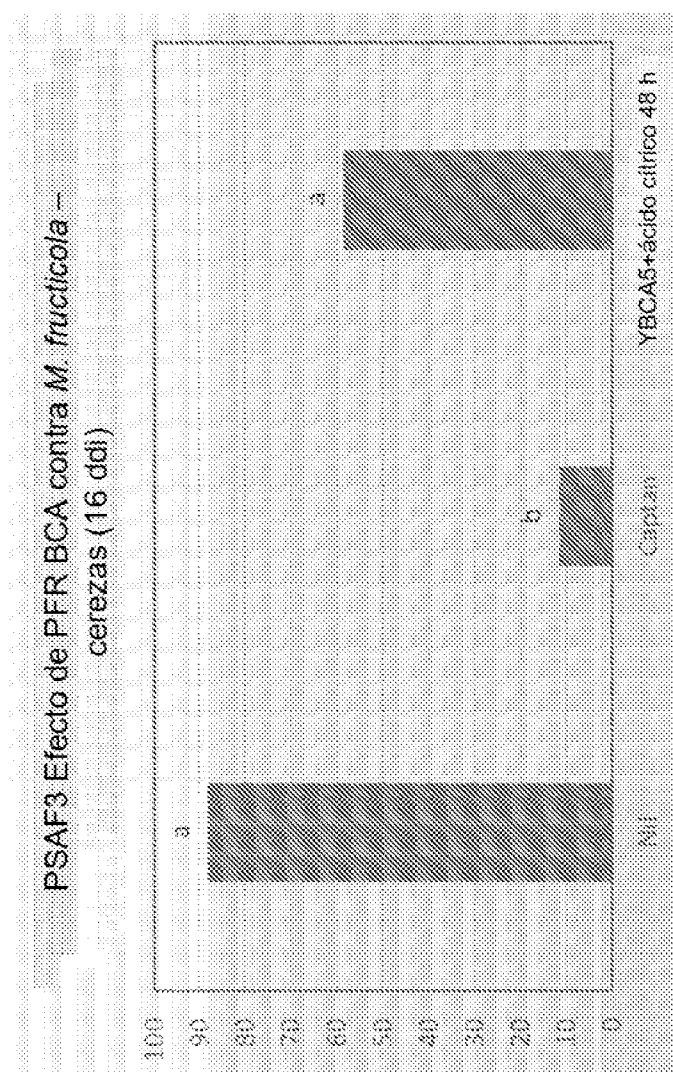


Figura 12

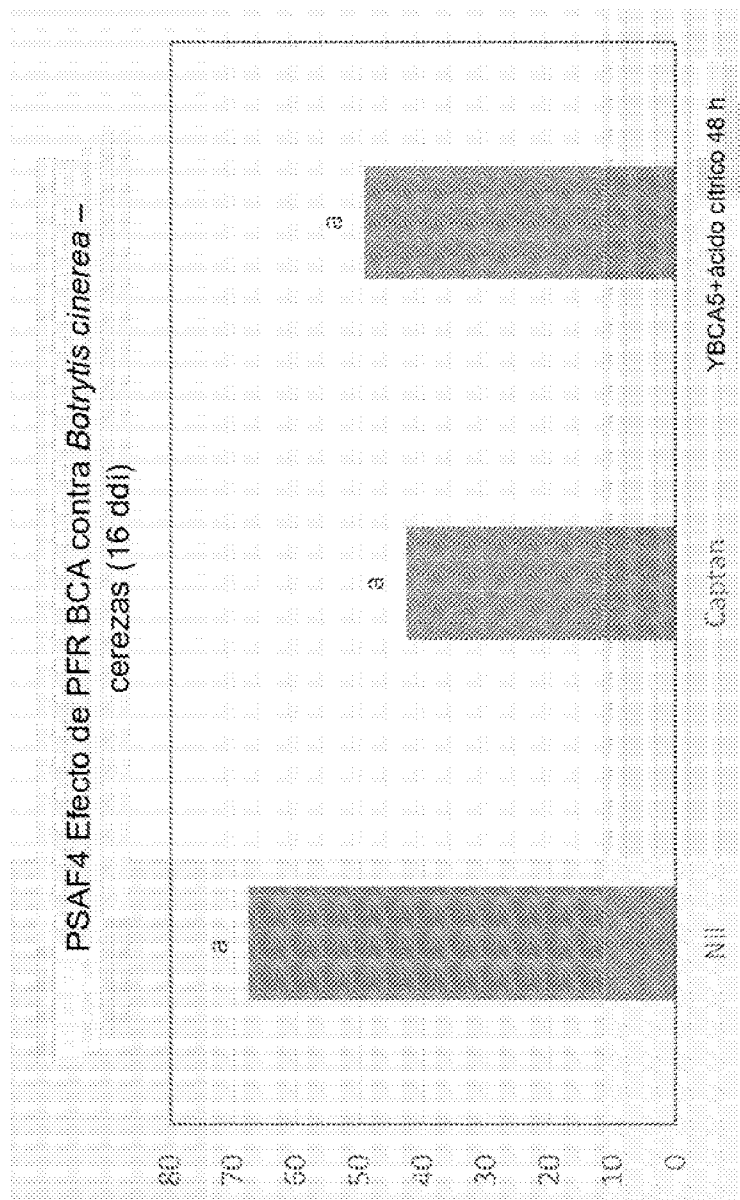


Figura 13

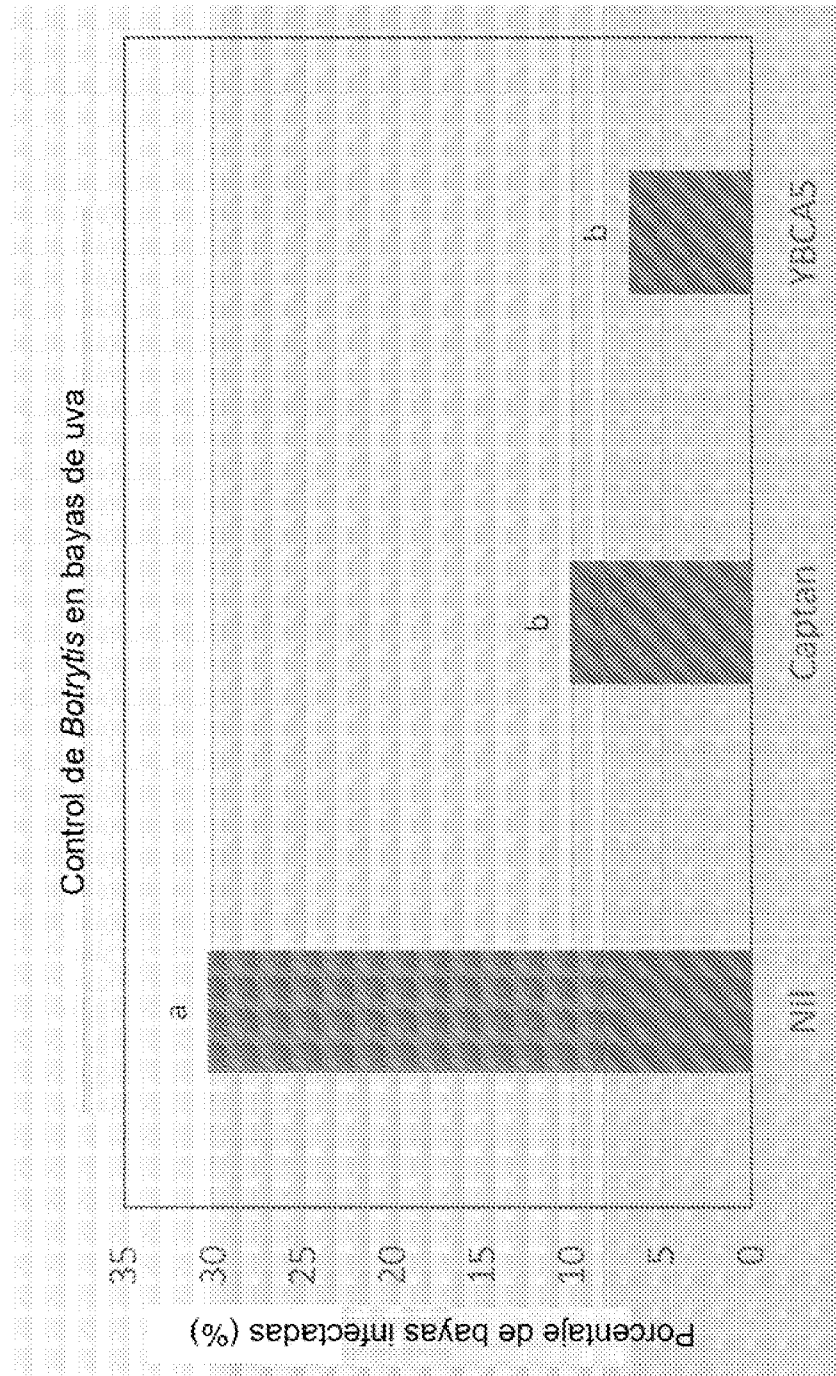


Figura 14

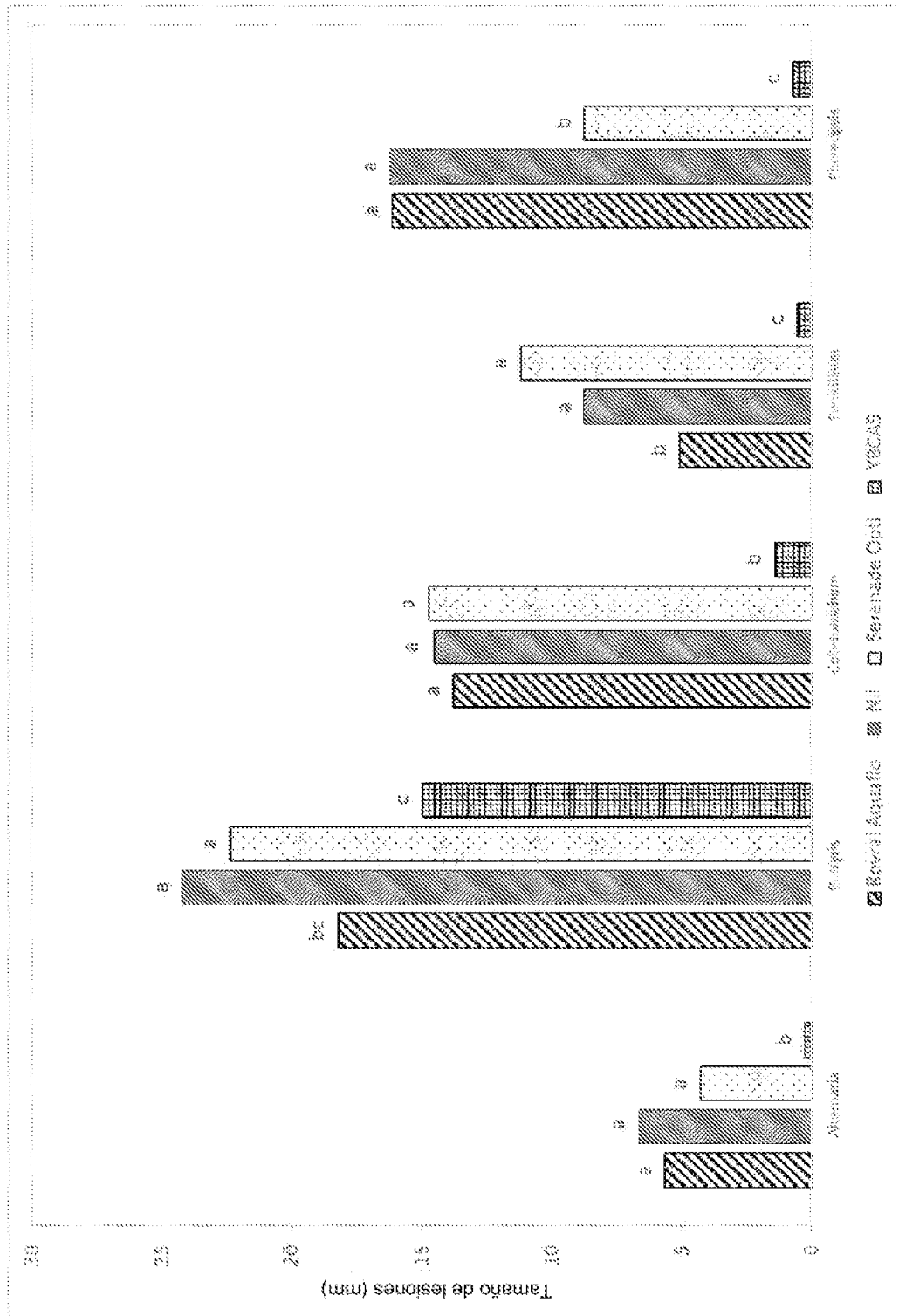


Figura 15

