



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 296 762**

⑤1 Int. Cl.:
A01N 63/04 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **01945837 .1**

⑧6 Fecha de presentación : **15.06.2001**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1401283**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2004**

⑤4 Título: **Control biológico de enfermedades de plantas.**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

⑦3 Titular/es: **The Horticulture and Food Research
Institute of New Zealand Limited
120 Mt. Albert Road
Mt. Albert, Auckland, NZ**

⑦2 Inventor/es: **Elmer, Philip, Albert, George;
Reglinski, Tony y
Hill, Robert, Anthony**

⑦4 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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 enfermedades de plantas.

5 Esta invención se relaciona con el uso del *Ulocladium oudemansii* como un agente de control biológico. También se proporcionan, los métodos y composiciones para el control biológico de enfermedades de la planta, particularmente el *Botrytis cinerea*, utilizando *Ulocladium oudemansii*.

Antecedentes de la invención

10 Las enfermedades de las plantas causadas por patógenos tales como hongos tienen un costo económico significativo para las industrias basadas en plantas. Las pérdidas pueden surgir a través de la descomposición de los productos pre- y pos-cosecha, la pérdida de plantas por sí mismas o a través de la reducción en crecimiento y habilidades para dar frutos.

15 Tradicionalmente, el control de patógenos de plantas se ha llevado a cabo mediante la aplicación de productos químicos tales como fungicidas. El uso de productos químicos se somete a un número de desventajas. Los patógenos pueden y han desarrollado tolerancia a productos químicos en el tiempo, produciendo poblaciones resistentes a los fungicidas. Los residuos químicos también pueden presentar peligros ambientales así como planteando la precaución de la salud.

20 El problema particularmente se ilustra en la uva e industrias del vino. La descomposición del racimo de las uvas, causado por el hongo *Botrytis cinerea*, se estima que causa pérdidas de \$18 millones de dólares por año solo en la industria del vino en Nueva Zelanda. El control de *Botrytis* ha sido por medio de fungicidas. La práctica es insostenible porque la resistencia al fungicida es muy común en muchos viñedos y hay presión de los consumidores para la reducción de los residuos de pesticidas.

25 El control biológico presenta una manera alternativa de controlar la enfermedad de la planta que es potencialmente más efectiva y específica que los métodos corrientes, así como la reducción de la dependencia en los productos químicos. Tales métodos de control biológico se perciben como una alternativa "natural" a los fungicidas con la ventaja de aceptación del gran público, la contaminación ambiental reducida y la sostenibilidad aumentada.

Los mecanismos de control biológico son diversos. Un mecanismo que ha sido demostrado efectivo es el uso de microorganismos antagonistas tal como bacteria, levadura y hongo para el control de la enfermedad de la planta.

35 El control biológico del hongo fitopatogénico tal como el *Botrytis cinerea*, con agentes de control biológico seleccionados (BCAs) se reportó por Wood en 1951 y después por Newhook en 1957 utilizando el hongo *Cladosporium cladosporioides* BCA. La introducción en ese momento de fungicidas baratos, efectivos y fáciles de aplicar detuvo cualquier otro desarrollo de los BCAs. Más recientemente, otros microorganismos antagonistas para utilizar en el control biológico de las enfermedades de las plantas han sido identificados.

40 El uso de *Ulocladium atrum* para controlar el botrytis en un rango de plantas ha sido propuesto, por ejemplo por: *Botrytis* en cebollas (Köhl *et al.*, 1995b), botrytis en lirios (Köhl *et al.*, 1995a, Elmer & Köhl, 1998), botrytis en ciclamino (Köhl *et al.*, 1998), y botrytis en uvas (Schoene *et al.*, 1999). Sin embargo, también hay informes de patogenicidad de alguna especie de planta mostrados por *U. atrum* (Butler *et al.* 1979).

La eficacia de varios *Ulocladium spp.* tal como el *Ulocladium atrum* como agentes de control biológico, también se han discutido por Elmer *et al.*, 1995; Walter *et al.*, 1996a,b; Boyd-Wilson *et al.*, 1998; Reglinski *et al.*, 1999, 2000, Hill *et al.*, 1998, Vanneste *et al.*, 1999, Michailides & Elmer, 2000.

50 Por consiguiente será apreciado que las especies *Ulocladium* claramente consideradas como las primeras candidatas para BCAs efectivos han sido extensamente investigadas durante la década pasada. Sin embargo, hasta hoy ninguno de los candidatos se ha probado ideal, ya sea debido a la precaución de patogenicidad de la planta o por el fracaso para establecer rápidamente en la planta objetivo más supervivencia de la variabilidad ambiental existente en el campo.

55 Sorprendentemente, los candidatos ahora han identificado una especie de *Ulocladium* que no se ha mencionado en ninguno de los primeros informes como un BCA efectivo. Los candidatos han determinado que esta especie, *Ulocladium oudemansii*, es altamente efectiva en el control del hongo saprophytic como el botritis y estableciendo exitosamente en tejidos de plantas en el campo. Por otra parte, hasta hoy no hay registros de que el *U. oudemansii* cause una enfermedad en las plantas o productos de plantas.

Es por consiguiente un propósito de la presente invención proporcionar una composición de control biológico que comprende al menos una cepa del *Ulocladium oudemansii* efectiva contra una especie *Botrytis*, o al menos proporcionar al público una opción útil.

Resumen de la invención

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona una composición de control biológico que comprende, en una forma y cantidad viables de manera reproducible, al menos una cepa de *Ulocladium oudemansii* efectiva contra una especie de *Botrytis* y un excipiente, diluyente o adyuvante aceptable en agricultura.

Preferiblemente, al menos una cepa esta presente en la forma de esporas viables de manera reproducible.

Actualmente es más preferido que la cepa es, o la composición incluya, *Ulocladium oudemansii* AGAL No. NM 99/06216.

La invención también proporciona un cultivo biológicamente puro de *Ulocladium oudemansii* AGAL No. NM 99/06216.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un proceso para controlar una especie de *Botrytis* en una planta o producto de planta, el proceso que comprende la aplicación de una composición de la invención a dicha planta o producto de planta.

La invención además proporciona un proceso para controlar una especie de *Botrytis* en una planta o producto de planta, el proceso que comprende la aplicación de una cantidad efectiva de al menos una cepa de *Ulocladium oudemansii* efectiva contra una especie de *Botrytis*.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de *Ulocladium oudemansii* en una composición o proceso de la invención.

La invención también se extiende al uso de una composición de la invención para la aplicación a plantas para controlar la infección de botritis.

Las plantas tratadas con la composición de la invención también forman otro aspecto de la invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 es un gráfico de barras que compara la eficacia del *Ulocladium oudemansii* aislado (AGAL No. NM 99/06216) en la supresión del desarrollo de botritis con el fungicida iprodione.

Figura 2 es un gráfico de barras que bosqueja el nivel de infección de botritis en racimos de uva en la cosecha- El asterisco (*) indica los racimos que muestran niveles de infección de botritis significativamente diferentes comparados con el control sin tratar a $P < 0.05$.

Figura 3 es un gráfico de barras que bosqueja el nivel de infección de botritis en los mismos racimos de uva después de dos días de incubación en humedad alta (condiciones que conducen al desarrollo de la enfermedad). El asterisco (*) indica racimos que muestran niveles de infección de botritis significativamente diferentes comparados con el control sin tratar a $P < 0.05$.

Figura 4 es un gráfico de barras que bosqueja el nivel de infección de botritis en los mismos racimos de uva después de catorce (14) días de incubación en humedad alta (condiciones que conducen al desarrollo de la enfermedad).

Figura 5 es un gráfico de barras que bosqueja el efecto de la frecuencia de aplicaciones del agente de control biológico NM99/06216 sobre niveles de *Botrytis* en racimos Chardonnay en el cierre del racimo durante la temporada en Hawkes Bay. 10d, 20d, 30d, se refiere al intervalo (en días) entre las aplicaciones NM99/06216.

Figura 6 es un gráfico de barras que bosqueja el efecto de la frecuencia de las aplicaciones del agente de control biológico NM99/06216 en niveles de *Botrytis* en racimos Chardonnay en la cosecha en Hawkes Bay y Marlborough en 1999. 10d, 20d, 30d, se refiere al intervalo (en días) entre las aplicaciones NM99/06216.

Figura 7 es un gráfico de barras que bosqueja los niveles de *Botrytis* en racimos Merlot (Gisborne), en la cosecha en y sobre los racimos Chardonnay (Marlborough) después de 48 horas de incubación en humedad alta después de la cosecha.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se dirige a las cepas de la especie *Ulocladium oudemansii* que tiene eficacia contra botritis y el uso de estas en el control de la enfermedad de la planta.

El *U. oudemansii* es un hongo saprophytic que se puede aislar del suelo, madera, hoja, fruta o semillas. Los aislados tienen las siguientes características de identificación en comparación con *U. atrum* (Simmons, 1967):

	Características		
<i>Ulocladium sp</i>	Micelio	Conidióforos	Conidio
<i>U. atrum</i>	Ca. diámetro 5 μ , amarillo a marrón dorado, suave o algunas veces al detalle se pone áspero	Hasta 120 x 3-8 μ , suave o verrugoso, marrón dorado	Marrón dorado o marrón rojizo oscuro, verde-oliva, uniformemente y con detalle verrugoso algunas veces elipsoidal u obovoide 15-32 μ x 11-18 μ con 1-3 septos transversales y 1 o más longitudinal pero predominantemente con 2 septos oblicuos completas que intersectan en los ángulos rectos pero más comúnmente esféricos o sub esféricos
<i>U. oudemansii</i>	diámetro 3-6 μ Sub hyline a marrón amarillo diluido, suave	Hasta 250 x 5-8 μ , marrón dorado suave, llevando un conidio solitario.	Inicialmente estrechamente obovoide, hialino y suave se torna marrón amarillo y discretamente se pone áspero: finalmente, ampliamente obovoide o elipsoidal marrón rojo oscuro a verde-oliva. Las dimensiones son 18-34 μ x 11-17 μ con 1-3 septos transversales y 1 o más longitudinales u oblicuos. El ápice es ampliamente redondeado y a menudo más vistosamente verrugoso que el resto del conidio puede ser suave
El texto en negrilla son las características que se pueden utilizar como una guía para distinguir entre estas dos especies, además de las características culturales y el crecimiento en HEA y PCA. descritos en la Tabla 1.			

Las cepas de *U. oudemansii* efectivas contra botritis y por consiguiente apropiadas para usar de acuerdo con la invención se identifican como aquellas que muestran al menos 50% de eficacia antagonista expresada como un porcentaje de reducción de los conidióforos de la pertinente especie de *Botrytis* comparada con el tratamiento control. A manera de ilustración, la metodología esquematizada después en el Ejemplo 3, se puede emplear para identificar los aislados de *U. oudemansii* de elección contra *B. cinerea*, mientras que los procedimientos análogos a aquellos del Ejemplo 3 se pueden emplear en relación a otras especie *Botrytis*.

Una cepa de *U. oudemansii* que reúne los requisitos anteriores se aisló de los desechos de hojarasca de la fruta de kiwi muestreados de un bloque de investigación de la fruta de kiwi en Massey University, Palmerston North, Nueva Zelanda, después de la incubación en cámaras de alta humedad, para inducir la producción de espores de saprofito. Esto demuestra la alta producción de esporas típicas del género cuando se cultiva en agar de harina de avena. Los detalles del proceso de aislamiento y selección empleado para obtener el aislado, se establecen en los Ejemplos. Este aislado de *Ulocladium. oudemansii* ha sido depositado en los Australian Government Analytical Laboratories, (AGAL), 1 Suakin Street, Pymble, New South Wales, Australia el 2 de Septiembre 1999 de acuerdo con el Tratado de Budapest para los propósitos del procedimiento de la patente. Al aislado se le ha otorgado el número de depósito NM 99/06216.

Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención se proporciona un cultivo biológicamente puro de *U. oudemansii* AGAL No. NM 99/06216. Del mismo modo se proporcionan las cepas de *Ulocladium* que tienen las características de identificación de AGAL NO. NM 99/06216.

AGAL No. NM99/06216 y otros aislados del *U. oudemansii* son particularmente agentes de control biológico efectivos, que son capaces de sobrevivir periodos de humedad interrumpidos, colonizando tejidos necróticos y suprimiendo el crecimiento de botritis y la producción de esporas en el campo. El grado de supresión por estos aislados de *U. oudemansii* es generalmente tan bueno como el comúnmente usado fungicida iprodione (RovralTM). La resistencia (por el *Botrytis cinerea*) que este particular fungicida ha desarrollado; en estas y otras instancias, los aislados de *Ulocladium oudemansii* seleccionados de acuerdo con la invención proporcionan una alternativa efectiva para el control de botritis. Esta inesperada y potente actividad en el control de enfermedad de la planta acoplada con la ausencia de algún informe de patogenicidad de la planta inducida por el *U. oudemansii* demuestra que los aislados de la especie tienen atributos deseables para utilizar como un agente de control biológico.

El término "agente de control biológico" (BCA) como se utiliza aquí se refiere a agentes que actúan como antagonistas de uno o más fitopatógenos. El antagonismo puede tomar diversas de formas. En una forma, el agente de control biológico puede simplemente competir externamente con el patógeno por nutrientes disponibles y/o por espacio en la planta huésped. En otra forma, el agente de control biológico puede suministrar el ambiente desfavorable para el patógeno. Por consiguiente, los mecanismos antagonistas incluyen pero no se limitan a antibiosis, micoparasitismo, competencia de nutrientes y desplazamiento físico.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición de control biológico que comprende al menos una cepa de *U. oudemansii* efectiva contra una especie de *Botrytis* y al menos un excipiente, diluyente o adyuvante aceptable en agricultura. La composición puede incluir múltiples cepas de *U. oudemansii*, pero preferiblemente incluye tres cepas o menos, y más preferiblemente una cepa única. En consecuencia, la composición comprende AGAL No. NM99/06216 aislado como una cepa única de agente activo contra al menos el *Botrytis cinerea*.

Las concentraciones efectivas de *U. oudemansii* como agente de control biológico en la composición pueden variar dependiendo del uso final, condición fisiológica de la planta; tipo, concentración y grado de infección del patógeno; temperatura, temporada, humedad, etapa en el periodo de crecimiento y la edad de la planta; número y tipo de fungicidas convencionales que se aplican; y tratamientos de la planta (tal como pelado y poda de hojas) pueden ser tenidos en cuenta en la formulación de la composición.

La cepa de *U. oudemansii* incluida como agente de control biológico debe estar en una forma viable de manera reproducible. Para otros propósitos, el *U. oudemansii* es deseablemente incorporado en la composición en la forma de esporas. La concentración de las esporas fúngicas en la composición dependerá de la utilidad para la cual la composición se va a someter. Un rango de concentración ejemplar es de aproximadamente 1×10^2 a 1×10^7 esporas por ml, preferiblemente de aproximadamente 1×10^3 a 2×10^6 , y más preferiblemente para *U. oudemansii* 1×10^4 a 2×10^6 esporas por ml.

Se anticipa que el uso convencional de tecnología de fermentación estática seca y líquida, las esporas de *U. oudemansii* de cepas seleccionadas se pueden producir a granel para una aplicación en campo. El crecimiento generalmente se lleva a cabo bajo condiciones aeróbicas a cualquier temperatura satisfactoria para el crecimiento del organismo. Un rango de temperatura a partir de 8 a 30°C, preferiblemente 15 a 25°C, y más preferiblemente, se prefiere a 20°C. El pH del medio de cultivo es ligeramente ácido a neutro, que es aproximadamente 5.0 a 7.0, y más preferiblemente 6.0. El tiempo de incubación es suficiente para que el aislado alcance una fase de crecimiento estacionaria, aproximadamente 3 a 4 semanas cuando se incuba a 18°C, y ocurrirá en la oscuridad. Las esporas se pueden cosechar por metodología convencional de filtrado o sedimentaria (por ejemplo centrifugación) o cosechado en seco utilizando un sistema de ciclón. Las esporas se pueden utilizar inmediatamente o almacenar, enfriadas entre 1° a 7°C, preferiblemente a 2°C, durante el tiempo que permanezcan viables de manera reproducible. Sin embargo generalmente se prefiere que se utilicen dentro de las dos semanas de la cosecha.

La composición de la invención también puede incluir excipientes, diluentes o adyuvantes aceptables en agricultura. Las composiciones también pueden comprender un amplio rango de aditivos tal como agentes tensioactivos, mojadores, humectantes, adhesivos, esparcidores, estabilizantes y penetrantes utilizados para realzar los ingredientes activos y los así llamados aditivos que destacan para mejorar el vigor de la espore, germinación y supervivencia tal como cloruro de potasio, glicerol, cloruro de sodio y glucosa. Los aditivos también pueden incluir composiciones que ayuden a mantener la viabilidad del microorganismo en un largo periodo de almacenamiento, por ejemplo aceite de

maíz sin refinar y las así llamadas emulsiones invertidas que contienen una mezcla de aceites y ceras en el exterior y del agua, alginato de sodio y conidio en el interior.

5 Ejemplos de agentes tensoactivos, esparcidores y adhesivos incluyen Fortune®, Pulse, C-Daxoil®, Codacide oil®, D-C. Tate®, Supamet Oil, Bond® Penetrant, Citowett® y Freeway.

Ejemplos de las composiciones apropiadas que incluyen excipientes, conservantes, agentes tensoactivos y agentes de humectación, esparcidores, y nutrientes se proporcionan en US 5780023 incorporada aquí por referencia.

10 Cuando se seleccionan para la inclusión, los agentes tensoactivos agrícolas comunes tal como Tween (disponible de Rohm & Haas) deseablemente se incluyen en la composición de acuerdo con los protocolos conocidos. Es importante que cualquiera de los aditivos utilizados esté presente en cantidades que no interfieran con la efectividad de los agentes de control biológico.

15 Los candidatos también han determinado que muchos fungicidas comúnmente usados no afectan adversamente el *U. oudemansii*. Las composiciones de la invención pueden por consiguiente también incluir dichos fungicidas. Como alternativa, las composiciones se pueden utilizar individualmente pero en conjunción con dichos fungicidas en programas control.

20 Las composiciones se pueden preparar en un número de formas. Una preparación comprende una forma en polvo de composición de la invención que puede ser espolvoreado. En otra forma, la composición se mezcla con un diluyente tal como agua para formar un vaporizador, espuma, gel o baño y aplicar apropiadamente utilizando protocolos conocidos. En la modalidad preferida actualmente, la composición *U. oudemansii* se aplica en 0.1% v/v de Tween 80 mezclado con agua utilizando un atomizador presurizado.

25 Las composiciones formuladas por otros métodos de aplicación tal como inyección, fricción o cepillado, también se puede utilizar, como ciertamente cualquier método del oficio conocido. Aplicaciones indirectas de la composición a la planta en el medio ambiente tal como suelo, agua, o como recubrimientos de la semilla son potencialmente posibles.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un proceso para controlar botritis en una planta, el proceso que comprende la aplicación de al menos una cepa de *U. oudemansii* efectiva contra una especie de *Botrytis*, o una composición de la invención a dicha planta.

35 El término “que controla” como se utiliza aquí generalmente comprende la prevención o reducción de la infección de botritis o inhibición del índice y extensión de dicha infección. También se contempla el tratamiento curativo.

Otra vez, mientras que múltiples cepas de *U. oudemansii* con actividad contra una especie *Botrytis* se pueden emplear en el proceso de control, preferiblemente tres cepas o menos, y más preferiblemente una cepa única se utiliza en el proceso. Actualmente en la modalidad más preferida, se emplea la cepa única de *U. oudemansii* AGAL No. NM99/06216.

45 Las aplicaciones repetidas en el mismo o diferente momento en un ciclo de la cosecha también se contemplan. El *U. oudemansii* se puede aplicar ya sea primero o después en la temporada. Esto puede ser durante la floración. El *U. oudemansii* también se puede aplicar inmediatamente después de la cosecha para colonizar rápidamente las hojas necróticas o senescentes y tallos cosechados a máquina (raquis) para prevenir la colonización de *Botrytis*, particularmente del *Botrytis cinerea* en hojas y tallos de la uva. El *U. oudemansii* también se puede aplicar para inactivar los viñedos en invierno para desacelerar el crecimiento de *Botrytis* en tejidos inactivos.

50 La aplicación puede ser a un tiempo antes o después de la explosión del brote y antes y después de cosecha. Sin embargo, el tratamiento preferiblemente sucede entre la floración y la cosecha. Para incrementar la eficacia, se prefieren, múltiples aplicaciones (por ejemplo, 2 a 6 aplicaciones durante las etapas fenológicas de la floración desde dar la fruta, o cierre del racimo para las uvas) del *U. oudemansii* o una composición de la invención.

55 Al repetir la aplicación del *U. oudemansii* o la composición también se debería considerar que sea después de la lluvia. Utilizando los modelos de predicción de *Botrytis*, la aplicación del BCA también se puede regular para medir los periodos de riesgo del *Botrytis*.

60 Actualmente en las modalidades preferidas, el *U. oudemansii* se aplica en una solución Tween 80 al 0.1% v/v utilizando un atomizador presurizado. Las partes de la planta se deben rociar ligeramente hasta justo antes de correr. Las aplicaciones se pueden hacer ya sea la planta completa en el dosel o solo en el área en el dosel donde las flores y desarrollo de la fruta se concentran (por ejemplo “línea del racimo” en uvas).

65 Las composiciones aplicadas control botritis. El *Botrytis spp.* es responsable para muchos de los hongos pre- y pos-cosecha que atacan partes de la planta y causan el hongo gris en las uvas y la fruta de kiwi, cosechas de invernadero, tomates de proceso, frutas con pepa, flores de corte, fresas, y plantas ornamentales así como en un exceso de otras plantas. En una modalidad, las composiciones de la presente invención son por consiguiente, deseablemente formuladas para utilizar contra uno o más de *Botrytis cinerea* y/o *Botrytis fabae*, *Botrytis aclada* y *Botrytis elliptica*,

Botrytis squamosa, *Botrytis allii*. Particularmente se contemplan, el control de *Botrytis cinerea* en uva utilizando las composiciones y el método de la presente invención.

El término “planta” como se utiliza aquí abarca no solo todas las plantas completas, sino se extiende a las partes de la planta, los cortes así como productos de plantas que incluyen raíces, hojas, flores, semillas, tallos, tejido de callo, nueces y fruta. Las plantas que pueden beneficiarse de la aplicación de la presente invención cubren un amplio rango de cultivos agrícolas y hortícolas. Las composiciones de la presente invención también son especialmente apropiadas para la aplicación en sistemas de producción orgánicos.

El proceso de la invención tiene particular aplicación en las plantas y productos de plantas, ya sea pre- o pos-cosecha. Por ejemplo, la composición de la invención se puede aplicar para almacenar productos del tipo enumerado arriba que incluyen frutas, vegetales, flores de corte y semillas. Las técnicas de aplicación apropiadas abarcan aquellas identificadas arriba, particularmente vaporización.

La composición potencialmente se puede utilizar para tratar o pre-tratar suelos o semillas, contrariamente a la aplicación directa a la planta. La composición puede encontrar uso en materiales que procesan la planta tal como revestimiento protector, cajas y sobrecubiertas.

También se abarca por la presente invención las plantas, productos de plantas, suelos y semillas tratados directamente con una cepa activa de *U. oudemansii* o una composición de la invención.

En otro aspecto, la presente invención se extiende al *Ulocladium oudemansii* de la invención para utilizar en una composición de la invención.

Los siguientes ejemplos no-limitantes se proporcionan para ilustrar la presente invención y de ninguna manera limitan el alcance de esta.

Ejemplo 1

Ulocladium oudemansii (AGAL No. NM 99/06216)

Este originalmente se aisló de los desechos de la hoja de la fruta kiwi de origen del huerto de investigación de la fruta kiwi Massey University en Palmerston North. La muestra de desechos de la hoja se incubó en una cámara de humedad alta para impulsar la producción de esporas por el hongo saprophytic. El conidio perteneciente al *Ulocladium spp.*, de muestra de desechos de la hoja, se cultivaron sobre agar de harina de avena para la purificación del cultivo y posterior prueba de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 3.

Características del *Ulocladium*

El aislado se identificó como *Ulocladium oudemansii* en el Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Delft, The Netherlands utilizando la referencia taxonómica de Simmons, EG (1967).

Características Morfológicas

El micelio marrón-verde-oliva pálido, suave o se pone áspero al detalle.

Las colonias en agar (agar de zanahoria patata, PCA) crecieron rápidamente, aterciopeladas negras o verde-oliva carbón-negro con un borde blanco. Después de 9 días a 20°C, el diámetro del cultivo es de 72 mm. En agar de harina de avena (OA) las colonias primero aparecen marrón (1-2 días) luego aparecen verde-oliva por los primeros 2-7 días, luego progresivamente se vuelven pardas así que la colonia total tiene una apariencia de color negro aterciopelado después de 3-4 semanas. El crecimiento de la colonia es rápido, de tal manera que la caja de petri total (diámetro 90 mm) se cubre después de 12 días en la oscuridad a 18°C. En PDA (agar de dextrosa patata), el crecimiento de la colonia es más lento, y el cultivo toma una apariencia de color más gris oscuro verde-oliva-pizarra. En este medio la caja de petri total (diámetro 90 mm) se cubre después de 14-16 días en la oscuridad a 18°C. En el agar de extracto de heno (HEA) el crecimiento fue de 40 mm después de 10 días a 10°C y luz UV continua. La colonia se caracterizó por que es más lobular. Las características de crecimiento, colonia y la morfología conidial de AGAL No. NM 99/06216 en HEA pueden ser una característica de discriminación útil como se resume abajo.

La colonia y características conoidal de aislados de *Ulocladium spp.* relacionados cultivados a 10°C con luz UV continua en agar de extracto de heno se esquematizan en la Tabla 1.

TABLA 1

Aislado	<i>Ulocladium</i> sp.	Diámetro de la colonia en;		Conidio llevado a;	Grado de "verrugas" en conidio
		PCA (9 días)	HEA (10 días)		
AGAL No.NM 99/06 216	<i>Ulocladium</i> <i>oudemansii</i>	72mm	40mm	Cadenas cortas	Pocas verrugas
HRU G	<i>Ulocladium</i> <i>oudemansii</i>	80mm	78mm	Sin cadenas	Toscamente verrugoso
HRV N	<i>Ulocladium</i> <i>oudemansii</i>	>85mm	68mm	Sin cadenas	Pocas verrugas
U385	<i>Ulocladium</i> <i>atrum</i>	70mm	50mm	Sin cadenas	Distintamente verrugoso

Morfología Conidial del *Ulocladium oudemansii*

Los conidióforos son abundantes, rectos o ascendientes, simples o ramificados, marrón dorado, suaves, sedosos, que llevan un conidio solitario en geniculaciones 1-5 uniportantes. Los conidios son inicialmente estrechamente ovoides, hialinas, suaves, se tornan marrón amarillento, y discretamente ásperos; finalmente ampliamente ovoides o elipsoidales, oscuro verde-oliva-carbón de 21.6-30.8 por 10.8-16.9 micrones con 1 o 3-5 septos transversales y uno o dos longitudinales u oblicuos, la base es ampliamente cónica a redondeada, el ápice ampliamente redondeado y a menudo más vistosamente verrugoso (verrugoso) que el resto del conidio. El conidio germina con facilidad en sustratos húmedos produciendo uno o más rápidamente hifas de cultivo por conidio.

Las fórmulas para PCA (Agar de Zanahoria y Patata), HEA (Agar de extracto de Heno), PDA (Agar de Dextrosa y Patata) y OA (Agar de Harina de avena) usadas en las pruebas anteriores se prepararon de acuerdo con Gams *et al.* 1998.

Ejemplo 2

Preparación de *Ulocladium oudemansii* para Experimentos de Campo

Los cultivos almacenados de *U. oudemansii* (que incluyen AGAL No. NM 99/06216), se preservaron en glicerol estéril 15% a -70°C y se almacenaron hasta que se requieran.

Los aislados de *U. oudemansii* se cultivaron en cultivos inclinados de agar de harina de avena (OA) en tubos de prueba de 35-50 ml con un tapón algodón hidrófilo, durante 2-3 semanas a 18°C en la oscuridad. Se adicionaron 10-20 ml de agua estéril Millipure™ (más 0.01% de Tween 80) a los cultivos inclinados, que luego se rasparon suavemente con un escalpelo estéril para desalojar el conidio. Porque una fermentación pequeña ocurre, la suspensión de espora resultante luego se adicionó a toda la avena orgánica humedecida (se somete al autoclave dos veces por 45 minutos a 12°C, 100 kPa) en bolsas de cultivo estéril (Type MBO3LPP, Van Leer flexible packaging, Pont-Audemer, France). Estas bolsas de cultivo luego se sellaron con cinta adhesiva e incubaron a 18°C en la oscuridad por 3-4 semanas.

Los aislados de *U. oudemansii* se prepararon por experimentos de campo utilizando el siguiente protocolo. Toda la avena colonizada se quitó de las bolsas de cultivo y se colocó en una bolsa de malla de nylon en un dispositivo de lavado de esporas (Miniwash 2000SR MW 100, Piraeus, Greece). Se adicionó agua Chilled Millipure™ (más 0.01% de Tween 80) y la avena colonizada completamente se lavó en este dispositivo por 30 minutos. La suspensión resultante se pasó a través de un filtro primario (malla = 4 mm x 4 mm) para extraer toda la avena y luego un filtro secundario que consiste de una gasa fina de nylon estéril (malla = 200 µm) para extraer pequeñas partículas y fragmentos miceliares. La concentración de esta suspensión se determinó con la ayuda de un hemocitómetro y se ajustó a 2×10^6 conidios ml⁻¹ con agua fría Millipure™ (más 0.01% de Tween 80) y se conserva en hielo a 5°C por un máximo de 2 semanas antes de utilizar en el campo. Nuestros estudios han mostrado que el almacenamiento a esta temperatura durante este lapso de tiempo no resulta en una reducción de viabilidad de espora o posterior germen tubo vigor. La suspensión aislada se aplicó a los racimos de uva premarcados (cv Chardonnay) utilizando nebulizadores neumáticos Yates MaxiSpray de 4L.

Ejemplo 3

Proceso para la Selección de Agentes de Control Biológico

5 Introducción

Los agentes de control biológico efectivos se pueden seleccionar de acuerdo con su capacidad para desplazar o excluir un microorganismo que causa una enfermedad potencial a partir de su sustrato o nicho ecológico. Bajo las condiciones que conducen fitopatógenos tal como *Botrytis cinerea* pueden colonizar muerte senescente o tejido necrótico. Saprófitos competitivos, no-patogénicos se pueden aplicar de manera que excluyan y/o competición en el exterior del fitopatógeno, por consiguiente la prevención o limitación de la capacidad para causar una enfermedad del patógeno. La efectividad de estos saprófitos en el campo es, a su vez, dependiente de su capacidad de supervivencia variando las condiciones climáticas, tal como periodos interrumpidos de humedad y deshidratación. Un método proporcionado por el cual los saprófitos competitivos con estas características pueden ser seleccionados. El método a continuación que se diseño originalmente por Dr Jurgen Kohl for onion and lily leaves (Köhl *et al.*, 1995a, 1995b).

Métodos

Los discos (diámetro 21 mm) se cortaron a partir de la uva sin rociar madura u hojas de fruta kiwi seleccionadas al azar y se colocaron entre láminas de cartón. Los discos se secaron suavemente a 40°C por aproximadamente 9 horas y luego se lavaron bajo agua corriente por 10 minutos para extraer cualquiera de los nutrientes solubles. Los discos de la hoja luego se secaron en papel secante una vez más en toallas de papel estériles, se secaron a 40°C por 6 horas, luego se sellaron en jarras plásticas de muestras, previo a la esterilización por irradiación gamma (4 Mrad).

Los aislados de hongo saprophytic tal como *Ulocladium spp.* se pueden aislar con facilidad a partir de la superficies del suelo, madera, hoja, fruta o semilla como se describe en el Ejemplo 1.

Los aislados se mantuvieron en agar de harina de avena (30 g de harina de avena finamente molido más 20 g de agar por litro de agua) e incubaron durante 2 a 4 semanas a 20°C iluminados de acuerdo con un ciclo de 12 horas día/noche. Los propágulos fúngicos se lavaron de las placas de agar de esporulación utilizando Tween 80 estéril al 0.01% (v/v) en agua destilada. Las suspensiones de esporas se filtraron a través de tejido estéril de lentes (Whatman) para extraer los fragmentos miceliares y se centrifugaron a 4000 rpm por 2 min. El sobrenadante se decantó con cuidado del pellet de la espora y las esporas resuspendidas en Tween 80 estéril al 0.01% (v/v) en agua destilada recién preparado. El procedimiento de centrifugación y lavado se repitió y la densidad final de esporas se ajustó a 1×10^6 conidios ml^{-1} con la ayuda de un hemocitómetro.

Los discos estériles de la hoja (4) se colocaron en una cámara de humedad alta que consiste de una caja de petri plástica estéril (diámetro 90 mm) que contiene 2 papeles de filtro estériles (Whatman), humedecidos con 2 mL de agua destilada estéril (SDW). Los discos de las hojas se refrigeraron (4°C) durante la noche para dejar impregnar el tejido en el agua aplicada. Continuando la rehidratación, los discos de la hoja se inocularon con una suspensión conoidal de *Botrytis cinerea* (1×10^4 esporas/ ml^{-1}) e incubaron en las cámaras de alta humedad por 8 horas a 18°C en la oscuridad. Después de este periodo de incubación, los aislados de los candidatos BCAs (saprófitos) se aplicaron a los discos de la hoja inoculados con *B. cinerea*, empañando una suspensión fina (1×10^6 esporas/ ml^{-1}) sobre los discos de la hoja en las cámaras de humedad. Los tejidos co-inoculados luego se incubaron en las cámaras de alta humedad por otras 16 horas a 18°C en la oscuridad.

La incubación a alta humedad se interrumpió por transferencia de los discos de la hoja a partir de las cámaras de humedad a las cajas de petri abiertas que contienen 2 capas de discos de filtro secos estéril (Whatman). Los discos de la hoja luego se secaron con aire en una cabina de flujo laminar por 6 horas a 20-22°C. Después de este periodo de deshidratación estimulada de los tejidos se vuelven a hidratar, por la aplicación de 2 mL SDW, luego se sellaron en la cámara de humedad e incubaron por 10 días a 18°C en la oscuridad. El área del tejido de disco de la hoja con esporulación de *B. cinerea* se evaluó visualmente. Los controles se emplearon; los discos de la hoja se vuelven a hidratar con inóculo cero, los discos de la hoja se vuelven a hidratar con inóculo de *B. cinerea* solo.

55 Análisis Estadísticos

Previo al análisis de varianza, todos los datos fueron transformados en arcsen utilizando una transformación angular para estabilizar la varianza y los valores LSD se calcularon para propósitos de separación media.

60 Resultados

Muchos aislados desempeñaron significativamente mejor la supresión de la esporulación que el fungicida convencional logrando una supresión del 90-100% de esporulación de *B. cinerea*. Los mejores aislados representados se seleccionaron por un bioensayo de laboratorio repetido para confirmar la supresión del *B. cinerea*. Los resultados del bioensayo repetido para el *Ulocladium spp.* solo se presentan en la Tabla 2. Los mejores aislados representados se seleccionaron por otra evaluación de campo y la confirmación de los bioensayos de laboratorio repetidos como se esquematiza en el Ejemplo 4.

TABLA 2

Supresión de la esporulación del *B. cinerea* por *Ulocladium spp.* en tejidos de hoja de fruta de kiwi necrótica con un periodo de humedad interrumpido en un bioensayo repetido para confirmar la eficacia antagonista

Tratamiento B.	% de alcance de tejido de hoja necrótica por conidióforos de <i>B. cinerea</i>
<i>cinerea</i> control	25
<i>Ulocladium spp.</i>	
<i>U. oudemansii</i> (AGAL No. NM 99/06216]	6 76 ^a
<i>U. atrum</i> [U385 Dutch aislado)	11 56
Fungicida (iprodione)	20 20
LSD (P<0.05)	5.6
^a eficacia antagonista, expresada como un porcentaje de reducción de conidióforos de <i>B. cinerea</i> comparado con el tratamiento control <i>B. cinerea</i> .	

Ejemplo 4

Para la prueba de campo de *U. oudemansii* (AGAL No. NM99/06216) los discos de hoja de fruta de kiwi necrótica rehidratados se colocaron sobre tiras pequeñas de plástico Coreflute™ (Waikato Signs, Hamilton, Nueva Zelanda) (5 discos por tira) e inocularon con *B. cinerea* como se describe arriba para las pruebas basadas de laboratorio, luego se transfirieron al dosel del cultivo sin rehidratación para la incubación por 22 horas bajo condiciones de campo. Los discos de la hoja inoculados del patógeno se regresaron al laboratorio, los inoculados con AGAL No. NM99/06216 como se describe arriba para las pruebas basadas de laboratorio, luego se regresaron al campo y se suspendieron en el dosel del cultivo. Todos los tratamientos fueron aleatorios en consideración a la posición en el dosel. Una vez más los tratamientos control se incluyeron; discos de la hoja con inóculo cero, los discos de la hoja con inóculo de *B. cinerea* solo. Ninguno de los tratamientos de pesticidas se aplicó por el agricultor durante el periodo de incubación de 10 días. Continuando la incubación bajo las condiciones de campo discos de la hoja se recolectaron del dosel del cultivo e incubaron en cámaras de alta humedad por 10 días como se describe arriba para las pruebas de laboratorio. Los discos se evaluaron por la producción de esporas de *B. cinerea* como se describe antes. Este procedimiento de detección en campo se repitió 11 veces para asegurar la exposición a un amplio rango de condiciones ambientales.

Resultados

El aislado AGAL No. NM99/06216 se desempeña significativamente mejor que el fungicida convencional, iprodione (Rovral®) en hasta 11 pruebas de campo repetidas. El aislado consistente y repetidamente redujo la esporulación de *Botrytis cinerea* por 80-100% (ver la Figura 1), aún cuando el *B. cinerea* se aplicó 22 horas antes de que el aislado se aplicara.

Discusión

El aislado AGAL No. NM99/06216 efectivamente suprime el crecimiento y la esporulación del *B. cinerea* en todos estos ensayos.

Ejemplo 5

Materiales y Métodos

Prueba de Campo

Los estudios de campo comienzan en un bloque de Chardonnay con una historia de *Botrytis cinerea*, en el sitio de Rivers Twin de Montana (Taradale, Napier, Nueva Zelanda). Ocho tratamientos (ver abajo) se seleccionaron y aplicaron a montajes de la vid únicos (ocho racimos marcados por vid) en cada uno de 5 replicas por filas (40 racimos por tratamiento en total). Hubo filas estandarizadas en cada lado del área tratada.

Tratamientos

- 1) Sin tratar
- 2) Pulse (0.1%)

- 3) Tween (0.05%)
- 4) Algan (0.5%; más Pulse)
- 5) AGAL No. NM99/06216 vaporizado (más Tween)
- 6) AGAL No. NM99/06216 Sumergido (más Tween)
- 7) aceite de hierba de limón (0.1%; más Pulse)
- 8) Shirlan (1 ml/L)

AGAL No. NM99/06216 suspensión de esporas ajustadas a 2×10^6 esporas/ml.

Aplicación

Los tratamientos se aplicaron en el verano y otoño temprano en Dic 15, Dic 23, Dic 30, Ene 13, Ene 28, Feb 12, Feb 24, Marzo 6, Marzo 16, Marzo 26, Abril 9. Los tratamientos se aplicaron a carrera, utilizando nebulizadores neumáticos portátiles con la excepción del tratamiento 6 al cual se aplicó sumergiendo los racimos.

Cosecha

La incidencia del *Botrytis* en la cosecha comercial fue muy baja. La cosecha de esta prueba se retrasó por dos semanas para fomentar el desarrollo de botritis. En Abril 21 los racimos marcados se cosecharon, se colocaron en bolsas de polietileno en hielo y luego se transportaron a HortResearch laboratories at Ruakura Research Centre. Los racimos se quitaron de las bolsas de polietileno y la descomposición del racimo se estimó por conteo del número de bayas en cada racimo que fue infectado con botritis.

Prueba de incubación a alta humedad

Con el fin de promover el desarrollo de botritis, después de la valoración de la cosecha cada racimo de uva se colocó en un contenedor de plástico (Plix Packaging, Carter Holt Harvey, Nueva Zelanda) con toallas de papel humedecidas en la base de cada contenedor para mantener un ambiente húmedo. Los contenedores fueron aleatorios y se incubaron a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La segunda valoración de la descomposición del racimo se realizó después de 2 días de incubación. Los racimos se dejaron incuban en humedad alta por otros 12 días con el fin de probar los tratamientos bajo condiciones severas. Después de este periodo los niveles de infección de botritis fueron muy altos y la descomposición del racimo se midió utilizando la siguiente escala:

Puntuación de Severidad del Racimo	% de infección del racimo
0	0
1	1-10
2	11-25
3	26-50
4	51-75
5	76-100

Análisis Estadísticos

Antes del análisis de la varianza los datos se transformaron utilizando una transformación angular para estabilizar la varianza. Un análisis de los datos en bruto dio conclusiones similares a aquellos del análisis después de la transformación, y por consiguiente los datos en bruto han sido presentados por simplicidad.

Resultados

Observaciones de Campo

Ninguno de los tratamientos causó algún daño visible a los racimos de uva. Las plantas de uva se examinaron a intervalos regulares para la presencia de botritis y la incidencia de la enfermedad fue muy baja. Por consiguiente, la cosecha se retrasó hasta Abril 21 para favorecer el desarrollo de botritis en el bloque de prueba.

Valoración de Botrytis en la cosecha

5 A pesar de que los niveles de botritis fueron bajos en la cosecha hubo efectos de tratamiento significante. Los racimos sin tratar y aquellos tratados con Algan, aceite de hierba de limón, Pulse y Tween tuvieron entre 7-17 bayas infectadas por racimo (aproximadamente 5-10% de infección) (Figura 2). Todos los otros tratamientos tuvieron niveles significativamente más bajos ($P < 0.05$) de botritis (<2% de infección).

Desarrollo de Botrytis en racimos después de 2 días de incubación en cámaras de alta humedad

10 Hubo un incremento general en botritis en los racimos después de 2 días de incubación en cámaras de alta humedad. Sin embargo, el nivel de infección en los racimos tratados con AGAL No. NM 99/06216 (aspersión o sumergido) y Shirlan permaneció significativamente ($P < 0.05$) menor que el control sin tratar (Figura 3).

Desarrollo de Botrytis en racimos después de 14 días de incubación en cámaras de alta humedad

15 Los niveles de infección del *Botrytis* fluctúan entre 75 a 83% en los racimos sin tratar y aquellos tratados con Pulse, Tween, Algan y aceite de hierba de limón. En los racimos tratados con AGAL No. NM99/06216 (aspersión y sumergido) el nivel de infección fue entre 36 - 41%. El tratamiento más efectivo fue Shirlan® donde la incidencia de botritis fue del 3% (Figura 4). Sin embargo este nivel de control se logró haciendo 12 aplicaciones de Shirlan®
20 durante la temporada, algo así, está fuera de la práctica comercial normal. En el viñedo, el uso de Shirlan® debería ser restringido cerca de la cosecha para evitar problemas potenciales de residuos y sería de esperar que se utilicen solo la mitad de este número de aplicaciones.

Discusión

25 Los elicitores, antagonistas y productos naturales antimicrobianos seleccionados se evaluaron para el control de botritis en uvas (cv. Chardonnay) en el viñedo Twin Rivers en Napier. Hubo reducciones significantes del *Botrytis cinerea* en los racimos tratados con AGAL No. NM99/06216 aislado y el fungicida Shirlan cuando se compara con los controles sin tratar en la cosecha. Los racimos luego se incubaron en condiciones de humedad alta para favorecer
30 el desarrollo de botritis. Después de 14 días de incubación, los niveles de botritis no obstante fueron significativamente más bajos en los racimos tratados con el aislado y Shirlan comparado con los controles sin tratar. El aceite de hierba de limón, Algan y los agentes de humectación Pulse y Tween no controlaron el botritis.

35 Esto es una demostración práctica del uso de un agente de control biológico para controlar el botritis en viticultura en el campo. Este excelente resultado indica el potencial de control biológico.

*Ejemplo 6**Introducción*

40 El propósito de este estudio, fue confirmar los hallazgos descritos arriba en el Ejemplo 5 y extender el alcance de la investigación. Las pruebas de campo se realizaron en dos principales regiones de cultivo de uva de Nueva Zelanda, Hawkes Bay y Marlborough, para determinar el impacto potencial de la variación regional y estacional en la eficacia del tratamiento de control biológico. Se presentan los resultados y la conclusión de este estudio.

*Métodos**Sitios de Prueba*

50 Las pruebas de campo se establecieron en Hawkes Bay y Marlborough. Los tratamientos (Tabla 3) se aplicaron a cada uno de los 10 racimos marcados por vid en montajes de vid sencillos (cv. Chardonnay) utilizando nebulizadores a presión Yates Plassay Maxi4. Hubo 5 replicas de viñedos por tratamiento con viñedos estandarizados sin tratar entre cada una de las filas estandarizadas de vid tratada y sin tratar en cada lado del área de bloque de prueba, para
55 proporcionar suficiente inóculo de *B. cinerea* para la infección de flores y frutas.

TABLA 3

Tratamientos para pruebas de campo 1998/99

1998/99 Pruebas del Viñedo		
Tratamiento	Programa de Aspersión	Localización
AGAL No. NM99/06216	cada 10, 20 y 30 días	Hawkes Bay & Marlborough
Solo remojo (Pulse)	cada 10 días	Hawkes Bay & Marlborough
Fungicida	Programa con vaporizador convencional *	Hawkes Bay & Marlborough
Las suspensiones de <i>U. oudemansii</i> contenían 2×10^6 conidios ml^{-1} en Tween 80 al 0.01% (v/v).		
* El programa de vaporizador convencional consiste de Switch ®, y Shirilan ® (Hawkes Bay) o Euparen® DF (Marlborough) aplicados durante la caída; Crop Care Captan WG aplicado cierre pre-racimo y en envero; y Rovral® Flo aplicado dos veces pre-cosecha (solo en Hawkes Bay).		

Los primeros tratamientos se aplicaron a inicios de noviembre en Hawkes Bay y a finales de noviembre en Marlborough. En lo sucesivo, las aplicaciones, se hicieron cada 10, 20 o 30 días (excepto los fungicidas que se aplicaron de acuerdo con el programa de vaporizador BOTRYTIS estándar convencional o industrial).

Valoración de la enfermedad

Los racimos pre-marcados visualmente se monitorearon en toda la temporada por cualquiera de las señales de fitotoxicidad y por la incidencia del botritis. Las valoraciones de la enfermedad se realizaron en Hawkes Bay a finales de enero y en ambos lugares a mediados de Marzo. En cada fecha, el número de bayas infectadas de botritis por racimo se registró. La incidencia de *Botrytis* fue baja en Marlborough y a tal grado que los racimos se quitaron de la vid, se incubaron por 48h bajo condiciones favorables para el desarrollo de botritis, luego se evaluaron. El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando ANOVA. Antes del análisis de varianza, los datos se transformaron utilizando una transformación angular para estabilizar la varianza. El análisis de los datos en bruto dio conclusiones similares a aquellas del análisis después de la transformación, y por simplicidad hemos presentado los datos en bruto.

Resultados

Valoración en Media-Temporada en Hawkes Bay

Ninguno de los tratamientos causó ningún daño observable a los tejidos de la uva en cualquier etapa de la temporada en el lugar de Hawkes Bay. La lluvia fuerte durante enero en Hawkes Bay fue seguida por el desarrollo de botritis en el bloque de prueba. Se observó abundante esporulación de botritis en los racimos sin tratar tanto en los viñedos estandarizados sin tratar como en los racimos sin tratar en los montajes, lo que indica que hubo abundante inóculo de botritis disponible para la infección en ese momento.

Los racimos en los viñedos sin tratar tuvieron el nivel más alto de botritis con aproximadamente 7 bayas infectadas por racimo (Figura 5). Todos los tratamientos con la excepción del control remojado en "Pulse", significativamente redujeron la incidencia de botritis. El tratamiento de *U. oudemansii* AGAL No. NM99/06216 del "día 10" redujo el botritis en más de un 80% y los tratamientos del "día 20" y "día 30" en más del 70%. Esto comparado favorablemente con el programa convencional de fungicida que reduce la incidencia de botritis por aproximadamente el 60%. No hubo evidencia de infecciones de botritis en el lugar de Marlborough en este momento.

Valoración de Botrytis en la Cosecha

Confirmación de la eficacia del Ulocladium oudemansii

La severidad de *Botrytis* en Hawkes Bay fue más alta en los racimos sin tratar con una media de 35 bayas infectadas por racimo. Los tratamientos con *U. oudemansii* AGAL No. NM99/06216 fueron al menos tan efectivos como el fungicida. Estos resultados confirman nuestros primeros hallazgos descritos arriba en el ejemplo 5.

Efecto de la variación regional y el intervalo de tiempo en la eficacia de U. oudemansii AGAL No. NM99/0 6216

La severidad de *Botrytis* fue más baja generalmente en Marlborough que en Hawkes Bay (Figura 6). Como el intervalo de tiempo entre las aplicaciones de *U. oudemansii* AGAL No. NM99/06216 se prolongó de cada 10 a cada 20, o cada 30 días, hubo una reducción en la eficacia del tratamiento. Sin embargo, el nivel de control de la enfermedad en todos los tratamientos aún comparado favorablemente con el programa convencional del fungicida en Hawkes Bay.

ES 2 296 762 T3

En Marlborough, donde hubo presión de la enfermedad mínima, los resultados fueron menos claros. La incidencia de *Botrytis* en todos los tratamientos de Marlborough, que incluyen el control sin tratar, fue menor del 8%.

Discusión

El *Ulocladium oudemansii* AGAL No. NM99/06216 se evaluó para el control de botritis en uvas (cv. Chardonnay) en los viñedos en Hawkes Bay y Marlborough. Todos los tratamientos *U. oudemansii* fueron tan efectivos como el fungicida, y en algunos casos significativamente mejor. Estos resultados confirman nuestros primeros hallazgos, como se describe en el ejemplo 5, y el resultado para Hawkes Bay fue especialmente alentador considerando que se colocó una presión muy alta del inóculo en los tratamientos (los viñedos estandarizados adyacentes y la mayoría de racimos en la vid no se trataron).

La aspersión cada 10 días podría añadir hasta como mucho 15 aplicaciones durante una temporada y esto puede ser indeseable para los cultivadores. Incrementando el intervalo de tratamiento a 20 o 30 días resulta en una reducción en la eficacia, pero no obstante proporcionando un nivel de control de la enfermedad equivalente a aquel obtenido con un programa convencional del fungicida. Otra manera de reducción de las aplicaciones del fungicida podría ser dirigir etapas de crecimiento particular. El trabajo en otras cosechas y con otros productos químicos ha demostrado que la supresión en la temporada inicial de botritis es importante en el control efectivo de la enfermedad (Nair & Allen, 1993). Exploramos esta estrategia en el Ejemplo 7.

Ejemplo 7

Introducción

El propósito de este estudio fue el de ampliar aún más el trabajo emprendido en el Ejemplo 6 y examinar el efecto de las aplicaciones dirigidas en el control de botritis. Una vez más las pruebas de campo se realizaron en dos principales regiones de cultivo de uva de Nueva Zelanda, Gisborne y Marlborough para tener en cuenta la variación regional y estacional en la eficacia del tratamiento. Los resultados y la conclusión de este estudio se presentan.

Métodos

Lugares de Prueba

Las pruebas de campo similares se establecieron en Gisborne y Marlborough. Los tratamientos (Tabla 4) se aplicaron a cada montaje del tratamiento de los 3 viñedos (cv. Chardonnay en Blenheim y cv. Merlot en Gisborne) utilizando nebulizadores backpack "Solo" de 15 litros. Hubo montajes de 5 replicas por tratamiento con viñedos estandarizados sin tratar en cualquier lado de cada grupo de viñedos tratados y filas estandarizadas sin tratar en cada lado del área del bloque de prueba para proporcionar suficiente inóculo de *B. cinerea*.

TABLA 4

Tratamientos

Tratamiento	Programa de Aspersión	Localización
Sin botriticidas	Azufre aplicado para mantener enfermedad de la uva pulverizable bajo control ¹	Gisborne & Marlborough
<i>U. oudemansii</i> AGAL No. NM99/06216	En floración, cierre del racimo y envero	Gisborne & Marlborough
Fungicida Estándar	programa de vaporizador estándar de la industria *	Gisborne & Marlborough
1. Azufre no se conoce que tenga ningún efecto en el control de <i>Botrytis</i> 2. Suspensiones NM99/06216 contenidas 2 x 10 ⁶ conidios ml ⁻¹ en 0.01% de Tween 80. 3. El programa de vaporizador estándar de la industria usado para controlar botritis fue Switch ®, y Euparen® DF aplicado durante caída; con Crop Care Captan WG aplicado en el cierre pre-racimo y en envero (dos vaporizadores en veraison en Gisborne);		

Excepto para el programa de fungicida estándar de la industria, los primeros tratamientos se aplicaron justo antes de la floración: Diciembre 3 en Gisborne y Diciembre 14 en Marlborough. Dos aplicaciones se hicieron en cada etapa de crecimiento aproximadamente 2 semanas aparte.

Valoración de la enfermedad

Los racimos pre-marcados visualmente se monitorearon en toda la temporada para la incidencia de botritis. Las valoraciones de la enfermedad se realizaron en ambos lugares a finales de enero / inicios de Febrero y nuevamente a mediados de Marzo, justo previo a la cosecha. En cada fecha el número de bayas infectadas de botritis por racimo se registró. La incidencia de *Botrytis* fue baja en Marlborough y de modo que los racimos se quitaron de la vid, se incubaron por 48 horas bajo condiciones favorables para el desarrollo de botritis, luego se evaluaron. El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando ANOVA. Antes del análisis de varianza los datos se transformaron utilizando una transformación angular para estabilizar la varianza. El análisis de los datos en bruto dio conclusiones similares a aquellas de los análisis después de la transformación, y por simplicidad hemos presentado los datos en bruto.

*Resultados**Valoración de Botrytis en Gisborne*

Ninguno de los tratamientos causada ningún daño observable a los tejidos de uva en cualquier etapa o de la temporada. La lluvia frecuente durante finales de enero y Febrero en Gisborne facilitó el desarrollo de botritis en el bloque de prueba. Al menos el 70% de los racimos tuvo alguna incidencia de botritis en la cosecha.

Valoración de Botrytis in Marlborough

En Marlborough las condiciones permanecieron extremadamente secas por toda la temporada y la incidencia de botritis fue como corresponde baja, aún cuando las bayas se incubaron por 48 horas en condiciones de campo para tratar e inducir el botritis utilizando la misma técnica como se describe en el Ejemplo 5.

Discusión

U. oudemansii AGAL No. NM99/06216 nuevamente se evaluó para el control de botritis en uvas (cv. Chardonnay) en los viñedos en Gisborne y Marlborough. En Gisborne, las condiciones fueron favorables para el desarrollo de la enfermedad pero el tratamiento *U. oudemansii* fue tan efectivo como el fungicida. Estos resultados confirman nuestros primeros hallazgos, como se describe en los ejemplos 5 y 6. En contraste, las condiciones en Marlborough no condujeron a la infección de botritis debido a la prolongada sequía en esta región durante la prueba. Sin embargo, algo de botritis de detectó y NM99/06216 redujo con severidad la enfermedad. El nivel de control de la enfermedad fue nuevamente equivalente a aquel del fungicida.

Estos ejemplos ilustran que el agente de control biológico, *U. oudemansii* AGAL No. NM99/06216 es capaz de reducir consistente y repetidamente la descomposición del racimo por botritis en uvas. Esto se repitió durante un rango de temporadas de cultivo y regiones de cultivo de uva.

Ejemplo 8

Eficacia de otros aislados que también pertenecen a la misma especie de U. oudemansii como AGAL No. NM99/06216

Introducción

Otros aislados de *U. oudemansii* han sido probados por su capacidad para controlar el *Botrytis*. El método usado para comparar la eficacia relativa de estos aislados, el mismo como aquel descrito en el Ejemplo 3.

Métodos

La preparación de los discos de la hoja, suspensiones de esporas, aplicación, registro del tiempo, y detalles de la incubación utilizada para el bioensayo fueron iguales a esos descritos en Ejemplo 3.

Análisis Estadísticos

Los datos se sometieron a un análisis utilizando ANOVA y los valores LSD se calcularon para propósitos de separación media utilizando el paquete estadístico GENSTAT.

Resultados

La supresión de la producción de esporas de *Botrytis* con diferentes aislados de *Ulocladium oudemansii* oscila entre 82-96% (Tabla 5).

TABLA 5

El efecto de diferentes aislados de *U. oudemansii* en el desarrollo de *B. cinerea* sobre tejidos de hoja de fruta de kiwi necrótica en un ensayo con un periodo de humedad interrumpido

Tratamiento	% alcance del tejido de hoja necrótica por conidióforos <i>B. cinerea</i>	
<i>B. cinerea</i> control	89	
<i>U. oudemansii</i> (código HRU G).	16	82 ^a
<i>U. oudemansii</i> (código HRU N)	4	95
<i>U. oudemansii</i> (AGAL No.NM 99/06216]	3.8	96
LSD (P<0.05)	7.6	
^a Eficacia antagonista, expresada como un porcentaje de reducción de los conidióforos de <i>B. cinerea</i> comparada con el tratamiento control de <i>B. cinerea</i> .		

Este ejemplo claramente demuestra que hemos probado otros aislados de *U. oudemansii* y comprobó que cada uno de ellos ha reducido significativamente el desarrollo de *Botrytis* al menos el 50%. Dos aislados AGAL No. NM99/06216 y *U. oudemansii* (código HRU N) redujeron el desarrollo de *Botrytis* al menos el 95% en este ensayo.

Referencias

Boff, P. 2000. Epidemiology and biological control of grey mould in annual strawberry crops. PhD thesis. Wageningen University. Wageningen, The Netherlands. 128pp.

Boyd-Wilson KSH, Perry JH, and Walter M. 1998. Persistence and survival of saprophytic fungi antagonistic to *Botrytis cinerea* on kiwifruit leaves. Proc. 51st New Zealand Plant Protection Conference 51: 96-101.

Butler D, Griffin MJ and Fletcher JT. 1979. Leaf spot on cucumber caused by *Ulocladium atrum*. *Plant Pathol.* 28: 96-97.

Domsch, K.H., Gams, W. and Traute-Heidi Anderson (1980). *Ulocladium* Preuss 1851 p 825 in Compendium of Soil Fungi Volume 1. Academic Press.

Eden MA, Hill RA and Stewart A. 1995. Biological control of *Botrytis* stem end infection of greenhouse tomatoes. *Plant Pathology* 45: 276-284.

Elad Y, Köhl J, and Fokkema NJ. 1994. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* in bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology* 104: 435-447.

Elmer PAG, Walter M, Köhl J, and Boyd-Wilson KSH. 1995. Progress towards biological control of *Botrytis cinerea* in New Zealand kiwifruit orchards. *European Journal of Plant Pathology* - Abstracts of the XIII International Plant Protection Congress, The Hague, The Netherlands, July 1995, Abstract 1415.

Elmer PAG and Köhl J. 1998. The survival and saprophytic competitive ability of the *Botrytis* spp. antagonist *Ulocladium atrum* in lily canopies. *European Journal of Plant Pathology* 104: 435-447.

Gams W, Hoekstra EE and Aptrot A. 1998. CBS-Course of Mycology, Fourth Edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures, baarn, 165pp.

Hill R, Walter M, Elmer P and Kay S. 1998. New methods for controlling botrytis in grapes (Abstract). *New Zealand Wine Grower Annual Research Supplement* 1996/ 1997 p. 8.

Köhl J, Molhoek WML, van der Plas CH, and Fokkema NJ. 1995a. Effect of *Ulocladium atrum* and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. *Phytopathology* 85: 393-401.

Köhl J, Van der Plas CH, Molhoek WML, and Fokkema NJ. 1995b. Effect of interrupted leaf wetness periods on suppression of sporulation of *Botrytis allii* and *B. cinerea* by antagonists on dead onion leaves. *European Journal of Plant Pathology* 101:627-637.

Köhl J, Gerlagh M, Haas BH, and Krijger MC, 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. *Phytopathology* 88: 568-575.

Lennartz B, Schoene P, and Oerke EC, 1998. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevine and *Septoria spp.* On wheat. Proceedings 50th International Symposium on Crop Protection Gen 63:3b 963-970.

Michailides, T and Elmer, P.A.G. 2000. Grey mold of kiwifruit caused by *Botrytis cinerea* in the United States and New Zealand. *Plant Disease* 84: 208-221

Mimbela-Leyva L, Passam HC, Reilly PJA and Wallbridge A, 1975. *U. chartarum*, another *Ulocladium* species commonly associated with fruit rots on honey dew melons imported into the UK from South America. *Trop. Sci.* 17:61-74.

Nair, N.G and Allen, R.N. 1993. Infection of grape flowers and berries by *Botrytis cinerea* as a function of time and temperature. *Mycological Research* 97: 1012-1014

Newhook FJ, 1957. The relationship of saprophytic antagonism to control of *Botrytis cinerea* Pers. on tomatoes. *New Zealand Journal of Science and Technology* A38: 473-481.

Reglinski T, Elmer P, and Hill R, 1998. New methods for suppressing powdery mildew in viticulture (Abstract). *New Zealand Wine Grower Annual Research Supplement* 1996/1997 p. 7.

Reglinski, T, Elmer PAG, and Hill RA. 1999. Botrytis Can we control it ? Proceedings of the 5th Annual Romeo Bragato Conference, Auckland, 26-29 August 1999.

Reglinski T, Elmer P, Wood P, and Hill R, 2000. Integrated use of an elicitor and a fungal antagonist to control Botrytis in grapes [Abstract SP42]. Durable Disease Resistance Symposium, November 28-December 1, 2000, Wageningen, The Netherlands.

Schoene P, Lennartz B, Oerke EC, Lyr H (Editor), and Russell PE, 1999. Fungicide sensitivity of fungi used for biocontrol of perthotropic pathogens. pp. 477-482 In: Dehne, H.W. and Sisler, H.D. (Editors) Modern fungicides and antifungal compounds II. 12th International Reinhardtsbrunn Symposium. Friedrichroda, Thuringia, Germany 24th -29th May, 1998.

Simmons EG. 1967. Typification of the Alternaria, Stemphylium and Ulocladium. *Mycologia* 59: 67-92. **Vanneste, J., Kay, S., Elmer, P.A.G., Reglinski, T and Hill, R.A. 1999.** *Biological control of economically important diseases in New Zealand.* (Poster abstract). International Symposium of Biological Control Agents in Crop and Animal Protection. Swansea, Wales, August 1999 **Walter M, Elmer PAG, Boyd-Wilson KSH, Perry J and Köhl J, 1996a.** Saprophytic suppression of *Botrytis cinerea* on kiwifruit leaf tissue (Poster abstract). Proc. 49th New Zealand Plant Protection Conference 49: 316.

Walter M, Boyd-Wilson KSH, Elmer PAG, and Köhl J, 1996b. Selection of antagonistic saprophytes for suppression of *Botrytis cinerea* sporulation on kiwifruit tissues (Poster abstract). Proc. 11th International Botrytis Symposium 23rd - 27th June, 1996, Wageningen, The Netherlands, p. 89.

Wood RKS, 1951. The control of diseases of lettuce by the use of antagonistic organisms. I. The control of *Botrytis cinerea* Pers. *Annals Applied Biology* 38: 203-216.

Zitter TA and Hsu LW, 1990. A leaf spot of cucumber caused by *Ulocladium cucurbitae* in New York. *Plant Disease* 74: 824-827.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

Documentos Patentes citados en la descripción

- US 5780023 A [0036].

Literatura no-patente citada en la descripción

- Epidemiology and biological control of grey mould in annual strawberry crops. **BOFF, P.** PhD thesis. 2000, 128 [0110]

- **BOYD-WILSON KSH; PERRY JH; WALTER M.** Persistence and survival of saprophytic fungi antagonistic to *Botrytis cinerea* on kiwifruit leaves. Proc. 51st New Zealand Plant Protection Conference, 1998, vol. 51, 96-101 [0110]
- 5 • **BUTLER D; GRIFFIN MJ; FLETCHER JT.** Leaf spot on cucumber caused by *Ulocladium atum*. *Plant Pathol.* 1979, vol. 28, 96-97 [0110]
- **DOMSCH, K.H; GAMS, W; TRAUTE-HEIDI ANDERSON.** *Ulocladium Preuss* 1851. Academic Press, 1980, vol. 1, 825 [0110]
- 10 • **EDEN MA; HILL RA; STEWART A.** Biological control of *Botrytis* stem end infection of greenhouse tomatoes. *Plant Pathology*, 1995, vol. 45, 276-284 [0110]
- **ELAD Y; KÖHL J; FOKKEMA NJ.** Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* in bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 1994, vol. 104, 435-447
- 15 • **ELMER PAG; WALTER M; KÖHL J; BOYD-WILSON KSH.** Progress towards biological control of *Botrytis cinerea* in New Zealand kiwifruit orchards. *European Journal of Plant Pathology*, July 1995 [0110]
- 20 • **ELMER PAG; KÖHL J.** The survival and saprophytic competitive ability of the *Botrytis* spp. Antagonist *Ulocladium atum* in lily canopies. *European Journal of Plant Pathology*, 1998, vol. 104, 435-447 [0110]
- **GAMS W; HOEKSTRA EE; APTRROT A.** *CBS-Course of Mycology*. 1998, 165 [0110]
- 25 • **HILL R; WALTER M; ELMER P; KAY S.** New methods for controlling botrytis in grapes, 1998, 8 [0110]
- **KÖHL J; MOLHOEK WML; VAN DER PLAS CH; FOKKEMA NJ.** Effect of *Ulocladium atum* and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. *Phytopathology*, 1995, vol. 85, 393-401 [0110]
- 30 • **KÖHL J; VAN DER PLAS CH; MOLHOEK WML; FOKKEMA NJ.** Effect of interrupted leaf wetness periods on suppression of sporulation of *Botrytis allii* and *B. cinerea* by antagonists on dead onion leaves. *European Journal of Plant Pathology*, 1995, vol. 101, 627-637 [0110]
- 35 • **KÖHL J; GERLAGH M; HAAS BH; KRIJGER MC.** Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. *Phytopathology*, 1998, vol. 88, 568-575 [0110]
- 40 • **LENNARTZ B; SCHOENE P; OERKE EC.** Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevine and *Septoria* spp. on wheat. Proceedings 50th International Symposium on Crop Protection Gen, 1998, vol. 63, 963-970 [0110]
- **MICHAILIDES, T; ELMER, P.A.G.** Grey mold of kiwifruit caused by *Botrytis cinerea* in the United States and New Zealand. *Plant Disease*, 2000, vol. 84, 208-221 [0110]
- 45 • **MIMBELA-LEYVA L; PASSAM HC; REILLY PJA; WALLBRIDGE A.** *U. chartarum*, another *Ulocladium* species commonly associated with fruit rots on honey dew melons imported into the UK from South America. *Trop. Sci.*, 1975, vol. 17, 61-74 [0110]
- 50 • **NAIR, N.G; ALLEN, R.N.** Infection of grape flowers and berries by *Botrytis cinerea* as a function of time and temperature. *Mycological Research*, 1993, vol. 97, 1012-1014 [0110]
- **NEWHOOK FJ.** The relationship of saprophytic antagonism to control of *Botrytis cinerea* Pers. on tomatoes. *New Zealand Journal of Science and Technology*, 1957, vol. A38, 473-481 [0110]
- 55 • **REGLINSKI T; ELMER P; HILL R.** New methods for suppressing powdery mildew in viticulture (Abstract. New Zealand Wine Grower Annual Research), 1998, 7 [0110]
- **REGLINSKI, T; ELMER PAG; HILL RA.** *Botrytis*. 1999 [0110]
- 60 • **REGLINSKI T; ELMER P; WOOD P; HILL R.** Integrated use of an elicitor and a fungal antagonist to control *Botrytis* in grapes. Durable Disease Resistance Symposium, 2000 [0110]
- 65 • Fungicide sensitivity of fungi used for biocontrol of perthotropic pathogens. Modern fungicides and antifungal compounds II. 1999, 477-482 [0110]

ES 2 296 762 T3

• **SIMMONS** EG. Typification of the *Alternaria*, *Stemphylium* and *Ulocladium*. *Mycologia*, 1967, vol. 59, 67-92 [0110]

• **VANNESTE**, J; **KAY**, S; **ELMER**, P.A.G; **REGLINSKI**, T; **HILL**, R.A. Biological control of economically important diseases in New Zealand. International Symposium of Biological Control Agents in Crop and Animal Protection, August 1999 [0110]

• **WALTER** M; **ELMER** PAG; **BOYD-WILSON** KSH; **PERRY** J; **KÖHL** J. Saprophytic suppression of *Botrytis cinerea* on kiwifruit leaf tissue (Poster abstract. Proc. 49th New Zealand Plant Protection Conference, 1996, vol. 49, 316 [0110]

• **WALTER** M; **BOYD-WILSON** KSH; **ELMER** PAG; **KÖHL** J. Selection of antagonistic saprophytes for suppression of *Botrytis cinerea* sporulation on kiwifruit tissues (Poster abstract. Proc. 11th International Botrytis Symposium, 1996, 89 [0110]

• **WOOD** RKS. The control of diseases of lettuce by the use of antagonistic organisms. I. The control of *Botrytis cinerea*. *Pers. Annals Applied Biology*, 1951, vol. 38, 203-216 [0110]

• **ZITTER** TA; **HSU** LW. A leaf spot of cucumber caused by *Ulocladium cucurbitae* in New York. *Plant Disease*, 1990, vol. 74, 824-827 [0110].

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de control biológico que comprende, en una forma y cantidad viable de manera reproducible, al menos una cepa de *Ulocladium oudemansii* efectiva contra una especie de *Botrytis* y un excipiente, diluyente o adyuvante aceptable en agricultura.
2. Una composición como se reivindica en la reivindicación 1 en donde al menos una cepa esta presente en la forma de esporas viables de manera reproducible.
- 10 3. Una composición como se reivindica en la reivindicación 2 en donde las esporas están presentes en un rango de concentración a partir de 1×10^2 a 1×10^7 esporas por ml.
- 15 4. Una composición como se reivindica en la reivindicación 3 en donde las esporas están presentes en un rango de concentración a partir de 1×10^3 a 2×10^6 esporas por ml.
5. Una composición como se reivindica en la reivindicación 4 en donde las esporas están presentes en un rango de concentración a partir de 1×10^4 a 2×10^6 esporas por ml.
- 20 6. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende al menos dos cepas de *Ulocladium oudemansii* efectivas contra una especie de *Botrytis*.
7. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde al menos una cepa es, o la composición incluye, *Ulocladium oudemansii* AGAL No. NM99/06216.
- 25 8. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde la especie de *Botrytis* es el *Botrytis cinerea*.
9. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que además comprende un agente tensoactivo.
- 30 10. Una composición como se reivindica en la reivindicación 9 en donde el agente tensoactivo es un Tween.
11. Una composición como se reivindica en la reivindicación 10 en donde el agente tensoactivo es Tween 80.
- 35 12. Una composición como se reivindica in cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la composición es en la forma de un polvo, vaporizador, espuma, gel o baño.
13. Un cultivo biológicamente puro de *Ulocladium oudemansii* AGAL No. NM99/06216.
- 40 14. Un proceso para controlar una especie de *Botrytis* en una planta o producto de planta, proceso que comprende la aplicación de una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 a dicha planta o producto de planta.
- 45 15. Un proceso para controlar una especie de *Botrytis* en una planta o producto de planta, proceso que comprende la aplicación de una cantidad efectiva de al menos una cepa de *Ulocladium oudemansii* efectiva contra una especie de *Botrytis*.
- 50 16. Un proceso como se reivindica en la reivindicación 15 en donde al menos una cepa de *Ulocladium oudemansii* es *Ulocladium oudemansii* AGAL No. NM99/06216.
17. Un proceso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 en donde la especie de *Botrytis* es el *Botrytis cinerea*.
- 55 18. Un proceso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 en donde la planta es una vid.
19. Una planta o producto de planta cuando se trata por un proceso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18.

FIGURA 1

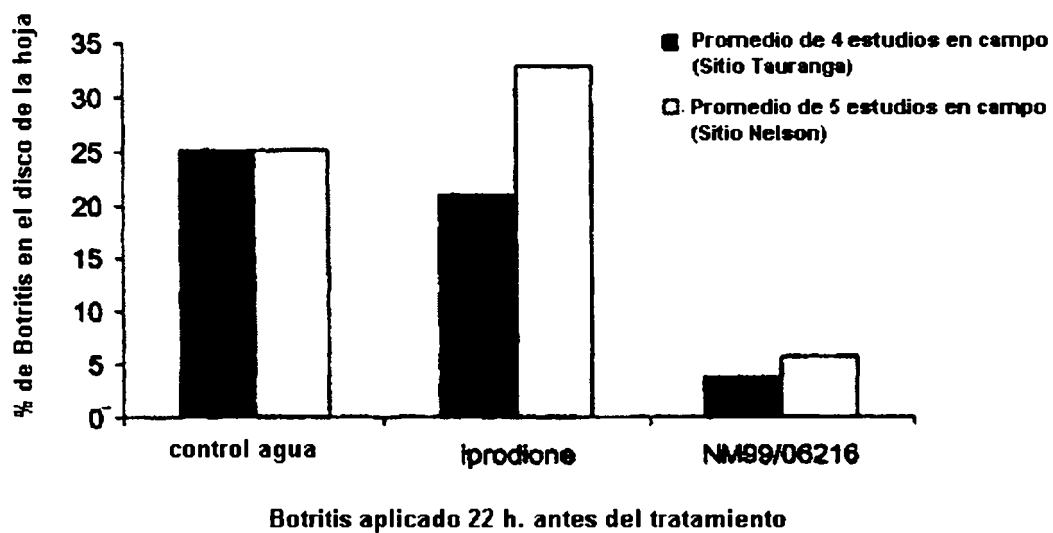


FIGURA 2

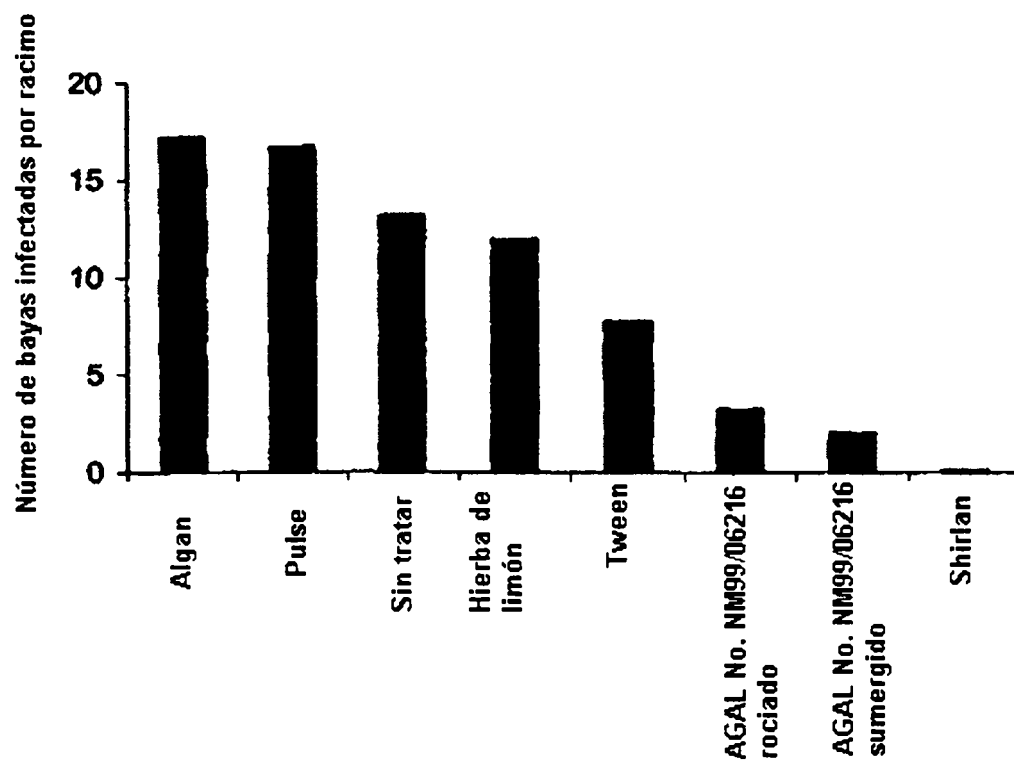


FIGURA 3

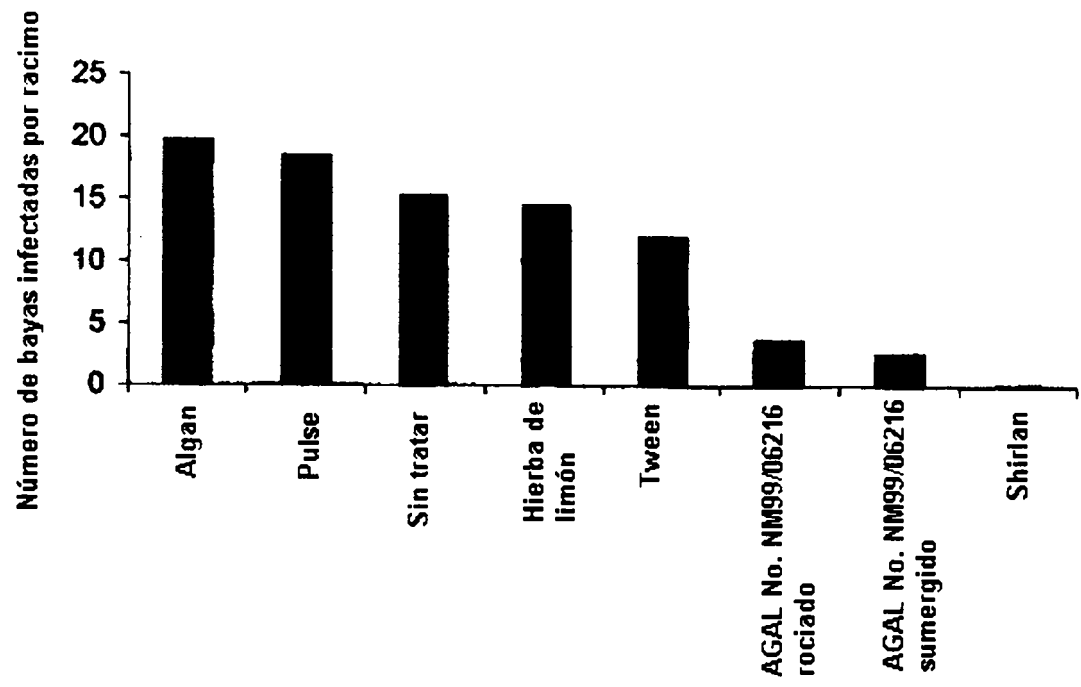


FIGURA 4

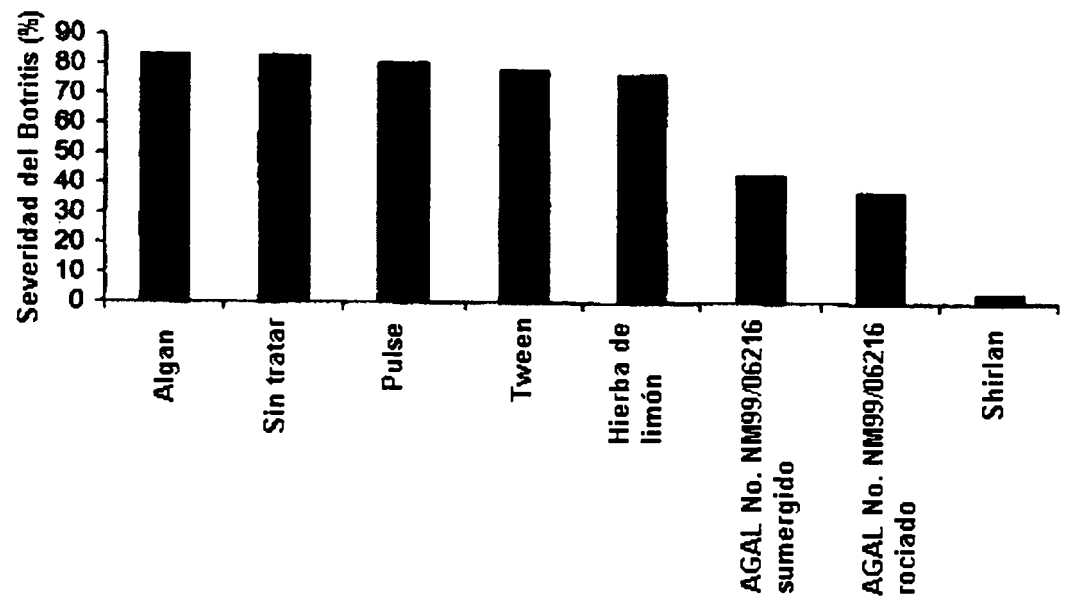


FIGURA 5

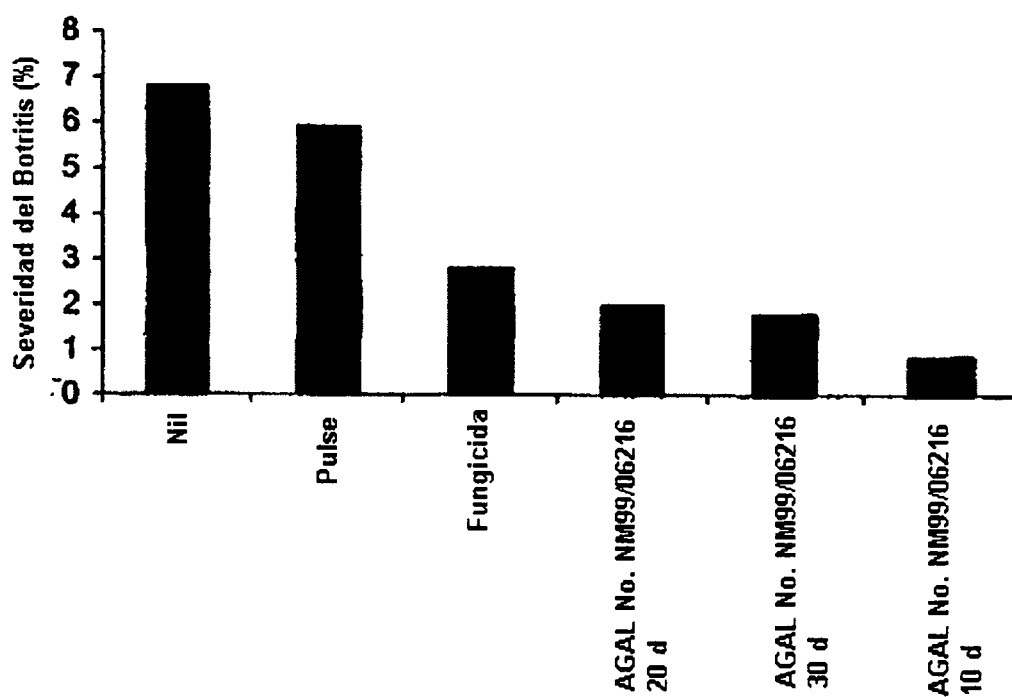


FIGURA 6

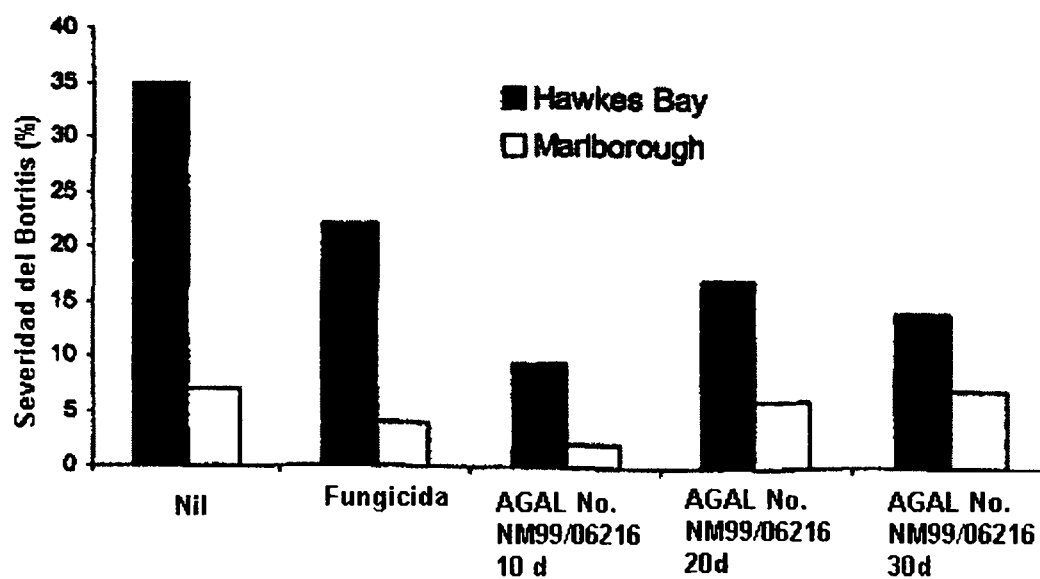


FIGURA 7

