



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 867**

51 Int. Cl.:
A01N 63/04 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02734935 .6**
96 Fecha de presentación : **30.05.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1401284**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2004**

54 Título: **Aislados fúngicos y composiciones de control biológico para el control de malezas.**

30 Prioridad: **30.05.2001 US 294475 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.11.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.11.2010

73 Titular/es: **Her Majesty the Queen in Right of Canada, as represented by the Minister of Agriculture and Agri-Food Saskatoon Research Centre, 107 Science Place Saskatoon, Saskatchewan S7N 0X2, CA**

72 Inventor/es: **Bailey, Karen, L. y Derby, Joanne**

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

Aislados fúngicos y composiciones de control biológico para el control de malezas.

- 5 La presente invención se relaciona con bioherbicidas. Más específicamente, la presente invención se relaciona con bioherbicidas y composiciones fúngicas que comprenden bioherbicidas fúngicos.

Antecedentes de la invención

- 10 El uso de pesticidas para matar insectos, malezas y otras plagas de enfermedades es común en agricultura. Se ha estimado que los agricultores canadienses gastan más de 750 millones en plaguicidas, y en Estados Unidos y Europa se estima que probablemente sea varias veces mayor. En las planicies canadienses, el 95% de la tierra sembrada con trigo, cebada, canola y lino se trata con uno o más plaguicidas. Sin embargo, a pesar del uso extensivo de plaguicidas, las malezas continúan originando pérdidas estimadas en los cultivos de mil millones de dólares solo en Canadá cada año.

- 15 Las malezas son dañinas para los cultivos agrícolas porque ellas son capaces de competir con las plantas de cultivo por espacio, sol y nutrientes. En particular, las malezas problemáticas incluyen cardo del Canadá, (*Cirsium arvense*) y otros miembros de la familia Asteraceae tal como el “coquillo” perenne (*Sonchus arvense*) y diente de león (*Taraxacum officinale*).

- 20 El cardo de Canadá (*Cirsium arvense* [L.] Scop) es una maleza perenne agresiva en los cultivos de campo, pasturas y veredas de camino, y es particularmente prevaleciente en el oeste de Canadá donde se presenta cerca del 50% de todos los campos. El cardo del Canadá origina pérdidas en el rendimiento de los cultivos de aproximadamente 15 a 60% de cereales, semillas oleosas y cultivos de legumbre, dependiendo de la densidad de la maleza. En cultivos de cereal, densidades de 6 a 20 plantas de cardo amarillo del Canadá por metro cuadrado da como resultado pérdidas del 18 al 30% en el rendimiento de granos. En 1937, el cardo de Canadá fue designado como una maleza nociva por la ley de Semillas Federal Canadiense.

- 30 Aunque las malezas de la familia Asteraceae, por ejemplo el cardo de Canadá y el diente de león, pueden reproducirse mediante floración, ellas son difíciles de erradicar por su sistema radicular intensivo. Las raíces son muy quebradizas y se fragmentan fácilmente durante la labranza. Esto da como resultado una mayor emergencia de retoños de los brotes estimulados. Además agregado a las dificultades de control, los fragmentos de raíz llevan suficientes reservas alimenticias para sobrevivir varios periodos bajo condiciones adversas.

- 35 El control del cardo de Canadá en cultivos de campo se logra habitualmente mediante siembra, en cultivos, y control químico de post-cosecha en herbicidas, aplicado a tasas suficientes para suprimir el crecimiento superior, matar las raíces. Por ejemplo, el glifosato se utiliza como un tratamiento de presembrado para matar el cardo del Canadá, o se utiliza en cultivos sobre cultivos tolerantes a glifosato. El Clopiralid se utiliza para control en cultivos para lograr el mismo efecto pero tiene problemas de actividad no residual para algunos cultivos en el siguiente año. Otras combinaciones de producto solo suministran supresión del crecimiento superior tal como el tifensulfurón y el tribenurón-metilo o fenoxi pro y MCTA. Otras opciones de control incluyen el crecimiento de cultivos competitivos y la siembra temprana para conseguir un crecimiento de cultivo vigoroso antes de la emergencia del cardo de Canadá y el cultivo superficial del suelo para reducir la fragmentación de la raíz y no crecimiento de retoños. También, se puede utilizar el podado para controlar las malezas a los lados de caminos, zanjas, bahías y líneas de cerca. El control de parches en lugar de campos completos se recomienda de nuevo para reducir los costos.

- 50 Existe un número de inconvenientes asociados con el control no químico de cardo del Canadá además de aquellos discutidos anteriormente. Primero, existen muy pocos cultivos que puedan competir con las malezas tales como el cardo de Canadá y muchos cultivos no se pueden sembrar lo suficientemente temprano para suministrarle al cultivo una ventaja competitiva con el cardo de Canadá. Además, los cultivos de semilla más temprano de lo usual puede ser un inconveniente para los agricultores. También, la siembra superficial del suelo y la poda de malezas para matar las malezas o evitar la floración de malezas son solo soluciones temporales y son a lo sumo efectivas marginalmente para controlar las malezas tal como el cardo del Canadá.

- 55 Existen también varios inconvenientes asociados con el uso de herbicidas químicos para controlar las malezas tal como el cardo del Canadá. Los herbicidas son costosos y pueden ser demasiado costosos para ser utilizados para algunos agricultores. Además, si un agricultor utiliza menos de la dosis requerida de herbicida para matar las malezas, existe un riesgo creciente de que algunas malezas puedan desarrollar resistencia herbicidas. También hay un riesgo creciente de resistencia herbicida al sobre-uso de un herbicida. Además, los herbicidas no están disponibles para todos los cultivos y todas las situaciones. Por ejemplo, no existe un herbicida efectivo disponible para cultivos tales como arvejas y lentejas mientras que algunos de los herbicidas químicos en los cultivos solo suprimen el crecimiento superior de las malezas sin controlar el crecimiento de raíz, que es una estrategia a corto plazo utilizada a menudo para cultivos tales como el trigo, cebada y la canola. La actividad herbicida residual también puede limitar la rotación de cultivos para algunos cultivos y algunas prácticas herbicidas agronómicas pueden incrementar las densidades de las malezas. Existen algunas preocupaciones acerca de la seguridad de herbicidas a corto y largo plazo, tanto los consumidores como para el ambiente.

Los temas ambientales en la industria agroalimenticia se han vuelto una prioridad con los gobiernos federales y provinciales, incluyendo el desarrollo de alternativas para los productos químicos del control de plagas, con la meta final de reducir el uso de pesticidas químicos. El incremento en los costos económico, social y ambiental asociados con temas agrícolas, arrastres de pulverizado, residuos pesticidas, y la legislación gubernamental para el uso reducido de plaguicidas, junto con el desarrollo de la resistencia a los herbicidas de las malezas hace de los agentes de control biológicos estrategias atractivas para el control de malezas tanto para agrícola como doméstico.

Las malezas de hoja ancha en situaciones de césped, tales como parques y canchas de golf, afectan la uniformidad visual deseada (es decir son desagradables), crean problemas en el mantenimiento del césped debido al aglomeramiento y a los hábitos de crecimiento de las malezas, competir con el césped por luz, nutrientes y agua. Las malezas también son irritantes para las manos cuando se producen reacciones alérgicas a su polen o son aplicados químicos para el control de malezas. Las malezas importantes en los pasos de césped pertenecen a las compuestas (tales como el diente de león, y la cerraja), las cariofiláceas, (tales como la cerastio), y las rubiáceas, y Convolvuláceas. Típicamente, el control de malezas en césped ha sido con herbicidas selectivos, no selectivos, sistémicos, y de contacto aplicado en varios momentos (pre-plantación, pre-emergencia y post-emergencia). La presión pública se está incrementando para evitar el uso de herbicidas químicos en lugares públicos tales como parques y céspedes en hogares, por ejemplo, algunas leyes han pasado recientemente en Calgary, Alberta, y Halifax, Nueva Escocia, todas en Canadá, contra su uso. Herbicidas químicos utilizados en estas áreas conducen a una exposición química creciente a grupos susceptibles en la población como niños, plagas y ancianos.

Un número de bacterias y hongos son patógenos naturales de las malezas y se ha sugerido que bioherbicidas, o mata malezas hechos de agentes biológicos en lugar de agentes químicos puedan suministrar una alternativa a los plaguicidas químicos. Por ejemplo, la Patente, No. 6,008, 159 describe controlar las malezas anuales utilizando el hongo *Pyrenophora*. Las patentes US Nos. 5,993,802 y 5,472,690 enseñan suprimir el crecimiento de *Calamagrostis canadensis* utilizando un aislado de un hongo basidiomicete a baja temperatura o un mioherbicida (incluyendo al menos uno o ambos de *Fusarium nivalis* y *Colletotrichum calamagrostidis*), respectivamente. Las patentes estadounidenses Nos. 5,952,264 y 5,635,444 enseñan controlar la hierba rastrera utilizando el hongo *Cochliobolus intermedius*, o los hongos seleccionados del género *Culvularia*, respectivamente. La Patente estadounidense No. 5,747,029 enseña a controlar malezas de vaina de hoz con el hongo *Myrothecium verrucaria*. La Patente US No. 5,698,491 y WO 98/08389 describe controlar malezas de "coquillo" con el hongo *Dactylaria higginsii* (WO 98/08389 y US 5,698,491). La Patente US No. 4,606,751 enseña a controlar el pasto Johnson y malezas similares con esporas de Bipolares sorghicola. Las esporas están suspendidas en una solución de agua y tensoactivo y son roscadas en un campo en el cual está creciendo la maleza. La Patente US No. 5,795,845 describe una composición bioherbicida que comprende un portador de emulsión invertido y un microorganismo que es una bacteria hongo débil o no patógeno. La composición se puede utilizar para controlar maleza de cerdo, cardo sin ciruelo hoja de terciopelo y cereza de tierra. La patente US 4,636,386 describe un aislado de *Alternaria* para el control de cardo italiano. La Patente US No. 5,994,27 describe una composición que comprende un bioherbicida que es un aislado de *Sclerotinia* minor que produce marchitamiento foliar y pudrición en especies de malezas de hoja ancha con el fin de inhibir su crecimiento. Los bioherbicidas se pueden utilizar para controlar el crecimiento de malezas de hoja ancha tales como el diente de león, el plátano de hoja ancha, ambrosia, piedra, el cardo maleza de nudo y el clavel blanco.

Brebaum y Boland (1999, Plant Disease 83: 2000) describe *Phoma exigua* y *Phoma herbarum* como patógenos del diente de león (*Taraxacum officinale*) sin embargo, ninguna maleza para controlar la actividad se reportó utilizando estas especies.

Ninguna de las referencias identificadas describe aislados de hongo derivados de *Phoma macrostoma* como composiciones de biocontrol adecuadas para el uso del control del cardo del Canadá, el diente de león y otras especies de malezas.

Subsiste la necesidad en la técnica de bioherbicidas novedosos y composiciones de biocontrol para controlar malezas. Además subsiste la necesidad en la técnica de bioherbicidas novedosos y composiciones de biocontrol para controlar plantas de malezas por ejemplo el cardo del Canadá, el coquillo el diente de león, el girasol de la pradera, la correhuela, alforfón, y la camomila sin aroma, los claveles, y la cerastio. Además, subsiste la necesidad en la técnica de composiciones de biocontrol que comprenden un agente de control biológico y un medio de crecimiento para soportar la viabilidad del agente de control biológico cuando la composición de biocontrol se emplea para controlar malezas.

Es un objeto de la presente invención solucionar las desventajas de la técnica anterior.

El anterior objeto se cumple mediante la combinación de las características de las reivindicaciones principales.

Las sub reivindicaciones describen además modalidades ventajosas de la invención.

Resumen de la invención

La presente invención se relaciona con bioherbicidas. Más específicamente, la presente invención se relaciona con bioherbicidas fúngicos y composiciones que comprenden bioherbicidas fúngicos.

De acuerdo con la presente invención se suministra un método para controlar una más malezas de hoja ancha que comprende administrar micelios de *Phoma cf. macrostoma* aislados de cardos del Canadá, y el extracto obtenido de los micelios de *Phoma cf. macrostoma*, o una combinación de los mismos al suelo donde crecen dichas malezas, en donde dichos extractos se seleccionan del grupo que consiste de inóculo de cebada muerta con calor, un extracto de cloroformo de dicho aislado de *Phoma cf. macrostoma*, un extracto de metanol de dicho aislado de *Phoma cf. macrostoma*, y extracto de etil acetato de dicho aislado de *Phoma cf. macrostoma*.

La presente invención también está dirigida al método definido anteriormente en donde una o más malezas de hoja ancha en unas especies de la familia seleccionada del grupo que consiste de compuestas, Cariofiláceas, Convolvuláceas, Plantagináceas, y Rubiaceas. Preferiblemente, una o más malezas de hoja ancha se seleccionan del grupo que consiste del cardo de Canadá, coquillo perenne, diente de león, chamomile sin aroma, claveles falsos, cerastio, alfardón silvestre, plátano, girasol de la pradera, correhuela, clavel y mostaza.

La presente invención suministra un agente de biocontrol que comprende micelios de uno o más de aislado de *Phoma cf. macrostoma*, aislado de cardo del Canadá, o un extracto obtenido de micelios de *Phoma cf. macrostoma*, o una combinación de los mismos, en donde dicho extracto se selecciona del grupo que consiste de inóculo de cebada muerta con calor, extracto de cloroformo de dicho aislado de *Phoma cf. macrostoma*, un extracto de metanol de dicho aislado de *Phoma cf. macrostoma*, y un extracto de etil acetato de dicho aislado de *Phoma cf. macrostoma*.

La presente invención también abarca una composición de biocontrol, que comprende un agente de biocontrol ya definido, y un medio para soportar la viabilidad de dicho uno o más de un aislado de de *Phoma cf. macrostoma*. Más preferiblemente, el uno más de uno de un aislado de de *Phoma cf. macrostoma*, se selecciona del grupo que consiste de

- a) 85-24B (IDAC 230201-, depositado Febrero 23, 2001)
- b) 89-25A (IDAC 110401-1, depositado Abril 11, 2001)
- c) 94-26 (IDAC 230201-2, depositado Febrero 23, 2001)
- d) 94-44B (IDAC 230201-1-3, depositado Febrero 23, 2001)
- e) 94-134 (IDAC 230201-4, depositado Febrero 23, 2001)
- f) 94-359A (IDAC 110401-2, depositado Abril 11, 2001)
- g) 95-54A1 (IDAC 230201-5 depositado Febrero 23, 2001)
- h) 95-268B (IDAC 110401-3 depositado Abril 11, 2001)
- i) 97-12B (IDAC 230201-6 depositado Febrero 23, 2001)
- j) 97-15B2 (IDAC 110401-4, depositado Abril 11, 2001) y una combinación de los mismos.

Se puede seleccionar un medio de un grupo que consiste de Agar, pesta, granulado de turba, vermiculita, arcilla, almidones, cardos de papa dextrosa, cardo de jugo V8®, granos de cereal y granos de legumbre.

La presente invención también está relacionada con un método para controlar malezas desarrolladas durante el crecimiento de cultivo que comprende:

- a) agregar una cantidad efectiva de un agente de biocontrol de la invención a una composición de biocontrol de la invención al suelo para producir suelo tratado;
- b) plantar los cultivos en el suelo tratado;
- c) desarrollar el cultivo.

De acuerdo con la presente invención también se suministra un método para controlar el desarrollo de malezas durante el crecimiento de cultivo que comprende:

- a) plantar el cultivo;
- b) agregar una cantidad efectiva de un agente de biocontrol de la invención a una composición de biocontrol de la invención al suelo donde se planta el cultivo;
- c) desarrollar el cultivo.

La presente invención también está dirigida a un método para controlar desarrollo de malezas durante el crecimiento del cultivo que comprende:

- a) agregar una cantidad efectiva de un agente de biocontrol de la invención a una composición de biocontrol de la invención a las semillas de cultivo para producir semillas de cultivo tratadas;
- b) plantar una semilla de cultivo tratada;
- c) desarrollar el cultivo.

También se incluyó en esta invención el método como se definió en donde la semilla de cultivo tratada es semilla de pasto, que incluye semilla de pasto doméstico especialmente césped, pastura de animal o mezclas de semilla de heno que comprenden uno o más de timoti, pasto azul, cizaña perenne, bromo, pasto de canario, semillas de pasto de huerto.

La presente invención también suministra un método para controlar desarrollo de malezas durante el crecimiento de un cultivo establecido que comprende:

- a) agregar una cantidad efectiva de un agente de biocontrol de la invención o una composición de biocontrol de la invención al cultivo establecido;
- b) desarrollar el cultivo.

También se incluye en esta invención el método como se definió en donde el cultivo establecido es pasto, que incluye pastos domésticos especialmente césped, pastura de animal o mezclas de heno que comprenden uno o más de timoti, césped, pasto azul, cizaña perenne, bromo, pasto de canario, pasto superior rojo y de huerto.

Los métodos de la presente invención se utilizan preferiblemente para controlar el desarrollo de malezas durante el crecimiento de un cultivo perenne. Preferiblemente, el cultivo perenne se selecciona del grupo que consiste de un césped, pasto perenne y un cereal de invierno. El cultivo puede ser un pasto y la semilla del cultivo puede ser semilla de pasto.

La presente invención también suministra un método para controlar el desarrollo de malezas que comprende aplicar un agente de biocontrol de la invención o una composición de biocontrol de la invención al suelo en donde dicha maleza crece.

El agente de biocontrol puede ser dicho uno o más de un aislado de de *Phoma cf. macrostoma*, o un extracto del mismo.

La presente invención también suministra cualquiera de los métodos anteriores donde el agente de biocontrol o la composición se aplica al suelo antes o después de la emergencia de la maleza, preferiblemente antes de la emergencia.

La presente invención también suministra cualquiera de los métodos anteriores en donde el agente de biocontrol la composición se aplica como polvo, restregable, esparcible, perforable, bandas, difusión, rociado, inyección líquida, vertido o empapado del suelo.

La presente invención abarca una semilla de cultivo recubierta, que comprende

- (i) micelios de uno o más aislados de de *Phoma cf. macrostoma*, aislados de cardo del Canadá o un extracto obtenido de micelios de de *Phoma cf. macrostoma*, y
- (ii) un ligador.

En donde dicho extracto se selecciona del grupo que consiste de un inóculo de cebada muerto con calor, un extracto de cloroformo de dicho aislado de de *Phoma cf. macrostoma*, un extracto de metanol de dicho aislado de de *Phoma cf. macrostoma*, y un extracto de etil acetato de dicho aislado de de *Phoma cf. macrostoma*.

La semilla del cultivo que está recubierta es preferiblemente semilla de pasto que incluye, semilla de pasto doméstico especialmente césped, pastura de animal, y mezclas de semilla de heno que comprenden uno o más de timoti, fresco, azul, pasto azul, cizaña perenne, bromo, pasto de canario, semilla de pasto superior rojo y de huerto.

La invención también suministra un método para controlar el desarrollo de maleza que comprende aplicar un agente de biocontrol de la invención a dicha maleza. La etapa de aplicar puede comprender empolvado, restregado, esparcido, difundido, rociado o vertido.

Este resumen no necesariamente describe todas las características necesarias de la invención sino que la invención también puede recibir en una sub-combinación de las características descritas.

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características de la invención serán más evidentes de la siguiente descripción en las cuales se hace referencia a los dibujos finales en donde:

Figura 1 muestra el efecto de diferentes cantidades de suspensión de inóculo 85-24B sobre plantas de cardo del Canadá. La escala de calificación es 1 = saludable, follaje verde oscuro saludable; 2 = follaje ligeramente amarillo-verde; 3 = hojas principalmente amarillas, algunas amarillas-verde, 4 = hojas principalmente blancas, unas pocas amarillo-verde; 5 = plantas completamente blancas; y 6 = muerte de plantas.

Figura 2. Muestra el efecto de los aislados fúngicos 94-44B, 94-26, 95-54A1 y 97-12B sobre la proporción de crecimiento de raíz del coquillo perenne.

Figura 3 muestra el efecto de aislados fúngicos 94-44B de biomasa foliar de coquillo perenne.

Figura 4 muestra el efecto del aislado fúngico 94-44B sobre la emergencia de coquillo perenne.

La Figura 5 muestra una representación gráfica de la mortalidad de malezas luego de la aplicación del aislado fúngico 94-44B, 89-25A y 97-12B a coquillo perenne.

Descripción de la modalidad preferida

La presente invención se relaciona con bioherbicidas. Más específicamente, la presente invención se relaciona con bioherbicidas fúngicos y composiciones que comprenden bioherbicidas fúngicos.

La siguiente descripción es de una realización preferida por vía de ejemplo solamente y sin limitación a la combinación de características necesarias para llevar a cabo la invención a la práctica.

Por el término “controlar crecimiento de maleza” o “actividad de control de malezas” se quiere decir que uno o más aislados fúngicos, un extracto de los mismos, un cardo inoculado de los mismos o una combinación de los mismos, cuando se aplica en o cerca a las malezas interfiere con el crecimiento normal o el desarrollo de una maleza. Ejemplos de actividad de control de el crecimiento de malezas incluye pero no está limitado a, inhibición del crecimiento de raíz, inhibición del crecimiento de brotes, inhibición de emergencia de brotes, reducción de inhibición de biomasa de malezas o producción de semillas, una capacidad de inducir clorosis, o reducir la competitividad de una maleza para agua, nutrientes, una combinación de los mismos, que de otra manera se utilizaría mediante una planta de cultivo. Alternativamente, el aislado de fúngico puede ser capaz de controlar las semillas al matarlas. Se prefiere que el aislado fúngico controle selectivamente el crecimiento de maleza, y no tenga ningún efecto sustancial sobre la planta para la cual se desea el crecimiento, por ejemplo una planta no objetivo tal como una planta agrícola importante, o pasto residencial comercial.

Los aislados fúngicos que controlan el crecimiento de de las malezas o exhiben actividad de de control de malezas se pueden caracterizar por tener un índice de control de maleza (WCI) de entre aproximadamente 20% a 100% (entre mayor el WCI, más eficaz el aislado fúngico). El WCI incluye un WCI anual (WCIA) o un WCI perenne (WCIP) como se define adelante.

Preferiblemente, los aislados fúngicos se caracterizan por tener un WCI de entre aproximadamente 50% a 100%. Más preferiblemente, los aislados fúngicos tienen un WCI de entre aproximadamente 70% a 100%. Sin embargo, se debe entender que el aislado fúngico con un WCI bajo puede aún probar ser efectivo para llevar el control del crecimiento de malezas y suministrarle a una planta no blanco una ventaja competitiva sobre una o más malezas. Adicionalmente, puede ser deseable utilizar uno o más aislados fúngicos que exhiban un WCI bajo con el fin de asegurar que la planta no blanco no se afecta por el bioherbicida.

El índice del control de maleza se determina utilizando la WCIA para evaluación de las malezas anuales, la WCIP para evaluación de los manejos perennes, como sigue.

$$WCIA = \{[(100 - \text{ffw}) + (\% M) + (\% \text{IOC})]/300\} \times 100\%$$

$$WCIP = \{[(100 - \text{RW}) + (100 - \text{FFW}) + (\% M) + (\% \text{IOC})]/400\} \times 100\%$$

donde

RW - es el peso de la raíz

FFW - es el peso fresco foliado

M - es mortalidad;

IOC - es la incidencia de la clorosis, determinada mediante el número de plantas con una calificación de 3-6, donde, 1= follaje verde oscuro saludable; 2= follaje ligeramente amarillo-verde; 3= hojas principalmente amarillas, algunas amarillo-verdes; 4= hojas principalmente blancas, o un poco amarillo-verde; 5=plantas completamente blancas; y 6 = plantas muertas.

Por “el lado fúngico” se quiere decir un *Phoma cf. macrostoma* biológicamente activo o un fragmento biológicamente activo, componente, obtenido o aislado del *Phoma cf. macrostoma*, por fragmento o componente de un aislado fúngico, se quiere decir un fragmento de el micelio o una o más esporas, picnidia, conidia, clamidosporas o una combinación de las mismas, obtenidas de los hongos. Los aislados fúngicos se pueden obtener de lesiones cloróticas y necróticas pequeñas sobre las hojas y los tejidos de tallos de una maleza deseada, por ejemplo pero no limitada a cardo del Canadá y ensayado para cantidad de control de crecimiento de maleza, como se describió aquí o utilizando métodos estándar como lo sabría un experto en la técnica. Ejemplos de aislados de *Phoma cf. macrostoma*, que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención, y que no van a ser considerados como limitantes de alguna manera, incluyen:

- 85-24B (IDAC 230201-1, depositado Febrero 23, 2001),
- 89-25A (IDAC 230201-1, depositado Febrero 23, 2001),
- 94-26 (IDAC 230201-2, depositado Febrero 23, 2001),
- 94-44B (IDAC 230201-3, depositado Febrero 23, 2001),
- 94-134 (IDAC 230201-4, depositado Febrero 23, 2001),
- 94-359A (IDAC 110401-2, depositado Abril 11, 2001),
- 95-54A1 (IDAC 230201-5, depositado Febrero 23, 2001),
- 95-268B (IDAC 110401-3, depositado Abril 11, 2001),
- 97-12B (IDAC 230201-6, depositado Febrero 23, 2001),
- 97-15B2 (IDAC 110401-4, depositado Abril 11, 2001),

o combinaciones de estos.

Por “extracto”, se quiere decir un extracto acuoso o disolvente, crudo un estado más purificado, que comprende uno más compuestos activos obtenidos de un aislado fúngico, que en la proximidad de, o cuando se aplica sobre, una maleza es capaz de controlar el crecimiento de la maleza.

Por un “cardo inoculado”, se quiere decir el cardo obtenido de un cultivo de uno más de un aislados de *Phoma*, (ver Ejemplo 5) como se definió aquí, que comprende uno más compuestos activos capaces de controlar el crecimiento de malezas. Un cardo inoculado se puede concentrar utilizando los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, pero no limitados a evaporación, roto-evaporación o secado por congelamiento.

Por “saturación” se quiere decir una capacidad de retención máxima de un suelo, y se define como ocurriendo cuando los poros del suelo en la parte superior del suelo se llenan con agua. Por “capacidad de campo” o “capacidad de humedad de campo”, se quiere decir el porcentaje de agua que permanece en un suelo dos o tres días después de haber sido saturado y después de que ha cesado el drenaje esencialmente.

Por “punto de marchitamiento permanente” se quiere decir la humedad crítica del suelo en las cuales las plantas se marchitan y no recuperan la turbidez cuando se colocan en la oscuridad y en una atmósfera húmeda.

En una modalidad preferida, el aislado fúngico se formula en una composición de biocontrol que comprende uno o más aislados fúngicos, uno o más extractos obtenidos de un aislado fúngico, a una combinación de los mismos, y una composición de biocontrol se agrega al suelo, agregada a compost, agregada a glóbulos tipo turba, agregadas o utilizadas a recubrir un medio de plantación, por ejemplo pero no limitado a pedazos de madera, utilizados para recubrir o tratar semillas de planta en la presencia de un ligador; pero no limitado a metil celulosa, almidón, arcilla, azúcar o combinación de los mismos, o aplicada a una planta, por ejemplo pero no limitada a, rociado o restregado sobre una planta, para control de malezas.

Adicionalmente, la inyección líquida se puede utilizar para aplicar uno más aislados, por ejemplo, esporas o micelios, extractos obtenidos de aislados fúngicos, o combinación de los mismos, al suelo. La inyección líquida se puede utilizar para aplicaciones perennes, por ejemplo pero no limitadas al manejo de paso de césped.

Por el término “composición de biocontrol”, se quiere decir una composición que comprende uno o más de un agente de biocontrol de la presente invención dentro de un agente de biocontrol A con medio adecuado consiste de uno o más aislados fúngicos como se definió anteriormente, un extracto de los mismos, a una combinación de ellos. Por ejemplo, si la composición de biocontrol comprende un aislado fúngico, entonces el medio adecuado puede comprender un medio de crecimiento para mantener la viabilidad del aislado fúngico antes, y después de la aplicación de la composición de biocontrol al suelo. Si un extracto de un estado fúngico, uno o más aislados fúngicos, o una combinación de los mismos se utilizan para - administración a una maleza o al suelo, entonces el medio adecuado puede comprender agentes estabilizantes, tensoactivos, y similares como sería conocido por u experto en la técnica. Por ejemplo, lo que no se debe considerar limitante de ninguna manera, el medio puede incluir Agar suplementado, 5 pesta, granulado de turba, vermiculita, arcilla, almidones, cardo de dextros de papa (PDB), cardo de jugo V8®, grano completo, fragmentos de grano de, por ejemplo pero no limitados a, granos de legumbre que incluyen lentejas o arvejas, o granos de cereal por ejemplo, trigo o cebada, o maíz o cualquier combinación o variante de las mismas, siempre y cuando el medio le permita al aislado fúngico permanecer viable.

La pesta es un término para un producto granular hecho de una harina de grano de cereal y un agente de biocontrol. El proceso encapsula los agentes de biocontrol en los productos similares a pasta denominados pesta (Connick *et al.*, 1991). Las bacterias formuladas en tal medio pueden exhibir vida de estante de campo extendidas (e. g Connick *et al.*, 1998). Estas características se desean en un producto que se pueda almacenar antes de uso o embarcar largas distancias antes de ser utilizado para control de semillas en un campo. Por lo tanto, las composiciones de biocontrol que comprende aislados fúngicos de la presente invención se pueden formular en un medio adecuado por ejemplo, 20 pero limitados a, pesta.

Si el medio adecuado es un medio de crecimiento, entonces el medio de crecimiento puede comprender cualquier medio líquido, semilíquido o sólido, que permiten que los aislados fúngicos de la presente invención crezcan o permanezcan viables. Cualquier medio de crecimiento conocido en la técnica que sea capaz de soportar el aislado fúngico se puede emplear. Ejemplos de medio de crecimiento adecuado, que no debe estar considerado limitantes, de ninguna manera incluyen Agar de dextrosa de papa, cardo de dextrosa de papa, cardo de jugo de V8®, y similares. Preferiblemente, el medio de crecimiento es un medio sólido, por ejemplo pero no limitado a grano por ejemplo un grano completo o fermento de los mismos, por ejemplo pero no limitados a, granos de legumbre que incluyen lenteja o arveja, o granos 30 de cereal por ejemplo trigo o cebada, o maíz (ver Ejemplo 3). El medio de crecimiento debe también permitir que una cantidad efectiva del aislado fúngico permanezca viable después de ser aplicado al suelo de un cultivo para o durante un periodo de tiempo adecuado, por ejemplo pero no limitado a, hasta aproximadamente 7 días a aproximadamente 18 meses después de la aplicación. Preferiblemente, el aislado permanece viable desde aproximadamente 14 días a aproximadamente 12 meses, y más preferiblemente desde aproximadamente 14 días a aproximadamente 90 días. Para la aplicación al suelo, las esporas, micelios (creciendo sobre granos), o esporas o micelios que crecen sobre grano se puede mezclar y aplicar sobre, o mezcladas con, el suelo. 35

Adicionalmente, la inyección de líquido se puede utilizar para aplicar uno o más aislados, por ejemplo, las esporas o los micelios, los extractos obtenidos, de los aislados fúngicos, son la combinación de los mismos al suelo. Las tasas de aplicación típicas para un estado fúngico que creció sobre el medio de crecimiento preferido incluyen, pero no están limitados a, 0,001 kg/m² a 5 kg/m² utilizando un tamaño de partícula entre 49-840 micrómetros y una viabilidad de partícula de 60-100%. La tasa preferida de aplicación es de 0,1 kg/m², a 1,0 kg/m². Sin embargo, se puede utilizar cualquier tasa de aplicación que dé como resultado actividad de control de malezas. 40

Cuando uno o más aislados fúngicos se aplican utilizando un medio sólido, por ejemplo cebada sin cáscara, el grano de cebada infestado preparado como se describió en el Ejemplo 3 se puede moler antes de la aplicación al suelo. Cualquier tamaño de gránulo adecuado se puede utilizar, por ejemplo, desde aproximadamente 50 micras a aproximadamente 1 mm. La viabilidad preferida de las partículas utilizadas para la aplicación es de aproximadamente 60-100%. Como se muestra en la Tabla 20, (Ejemplo 3), con un tamaño de gránulo más pequeño, un logro de una tasa de dosis de aplicación inferior (g/m²) logrará una actividad de control de malezas similares o mejor. 50

También se contempla por medio de la presente invención que más de un aislado fúngico se puede utilizar para controlar las malezas. De manera similar, una composición de biocontrol puede comprender más de un aislado fúngico. Los aislados fúngicos múltiples capaces de controlar una maleza específica se pueden utilizar o aislados fúngicos múltiples, cada uno de los cuales es capaz de controlar un tipo distinto de maleza se puede mezclar y utilizar como se describe aquí. También se prefiere que el aislado fúngico o la composición de biocontrol exhiban una selectividad de huésped, en esa actividad de control de maleza se observa en una o más maleza blanca, aunque no se observa ninguna actividad de control de maleza en las plantas no blanco. Ejemplos de plantas no blanco incluyen plantas agrícolas con importantes, y pastos domésticos y comerciales (gramíneas). 60

Por maleza, se quiere decir cualquier planta indeseable. Preferiblemente, una maleza es una maleza de hoja ancha (dicotiledónea), por ejemplo pero no limitada a miembros de las compuestas, Cariofiláceas, Polygonáceas, Convolvuláceas, Plantagináceas y Rubiáceas. Más preferiblemente, una maleza se selecciona del grupo que consiste de:

65 Compositae (familia compuesta): incluye [*Tarazacum officinale* L]

Oxeye daisy [*Chrysanthemum leucanthemum*]burdocks por ejemplo common burdock [*Arctium minus*], goat'sbeards [e.g *Tragopogon dubius*], cockleburrs [e.g *Xanthium strumarium*] ragweeds por ejemplo common

ragweed [*Ambrosia artemisiifolia*] o giant ragweed [*Ambrosia trifolia*] *Zanilla inodora* [*Matricaria perforata* Merrat.], sow-thistles, por ejemplo *perennial coquillo* [*Sonchus arvensis* L], y thistles por ejemplo *Canada thistle* [*Cirsium arvense* L. (Scop.)];

- 5 Cariofiláceae (Familia de la Rosada): incluyendo cerastio [*Stellariamedia* (L) Vill];
- Poligonáceae (Familia de trigo sarraceno): incluye trigo sarraceno silvestre [*Polygonum convolvulus* (L). Vill];
- 10 Convolvuláceae (Familia de la Gloria de la Mañana): incluyendo maleza ligada de campo [*Convolvulus arvensis* L];
- Plantagináceae (Familia del Plátano): incluyendo plátano [*Plantago lanceolata*]; o
- 15 Rubiáceae (Familia del Rubus): incluyendo claveles falsos [*Gallium spurium*].

Preferiblemente los aislados fúngicos, las composiciones de biocontrol, o ambos, de la presente invención se agregan al suelo donde la semilla crece o puede crecer. El suelo se puede mezclar de tal manera que uno o más aislados fúngicos están en proximidad cercana al sistema de maleza o a los fragmentos de raíz de las malezas. También es preferible que los aislados fúngicos estén en proximidad cercana a las semillas de maleza cuando tales semillas están presentes. Los aislados fúngicos y las composiciones de biocontrol de la presente invención se pueden aplicar al suelo o a la maleza o a cualquier método conocido e la técnica como tal, pero no limitadas a empolvado, restregado, esparcido, perforado puesta de pandas, difusión (con o sin incorporación), rociado, inyección de líquido, vertimiento o empapado del suelo. Los aislados fúngicos y las composiciones de biocontrol también se pueden aplicar en cualquier momento adecuado, por ejemplo pero no limitado a, durante o después la labranza del suelo. Preferiblemente, la composición de biocontrol se aplica durante la primavera, o a comienzos del verano. La preparación sólida del aislado fúngico solo o la composición de biocontrol por ejemplo pero no limitada a un grano de cebada infestado, se agrega al suelo en una cantidad de aproximadamente 0,1 kg/m² a aproximadamente 5 kg/m². Las suspensiones de líquido de aproximadamente 10³ a aproximadamente 10⁹ cfu/mL se puede aplicar a una tasa de aproximadamente 1 L/m² a aproximadamente 5 L/m². Sin embargo, se puede aplicar cualquier cantidad que resulte en actividad de control de maleza.

También dentro del alcance de la presente invención, esos extractos obtenidos de uno más aislados fúngicos se pueden formular y aplicar al suelo o la maleza como un líquido, por ejemplo como un rociado, inyección, empapado, restregado, empolvado, o como un sólido, incluyendo gránulos de cebada infestada en autoclave empolvado o restregado de extractos adecuadamente formulados. Como un experto lo podrá determinar, las dosis apropiadas dependerán de la concentración de los componentes activos dentro del extracto o sólido. Preferiblemente, el extracto se deriva de un cardo crudo de cuatro semanas concentrado aproximadamente 100X en volumen original, o de un extracto obtenido de una proporción 3:1 del micelio extraído a metanol. Un ejemplo, que no se debe considerar limitante, de una tasa de aplicación de tales extractos es de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2.5 L/m² dependiendo de la concentración de los ingredientes activos. Sin embargo, cualquier cantidad que resulte en la actividad de control de maleza se puede aplicar.

Un agente de biocontrol, o una composición de biocontrol, de la presente invención se puede agregar a un medio de plantación, por ejemplo compost, o se puede agregar o ser utilizado para recubrir un medio de plantación alternativo; por ejemplo pero no limitado a pedazos de madera, cubiertas de paisaje, vermiculita y similares, como será evidente para un experto en la técnica. Adicionalmente, el agente de biocontrol o la composición de biocontrol como se describió aquí se puede utilizar para recubrir o tratar semillas de plantas. La semilla de planta puede involucrar el uso de un ligador, por ejemplo pero no limitado a metilcelulosa, almidón, arcilla, azúcar, o combinación de los mismos.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se suministra un método para controlar un rango de malezas con un bioherbicida que comprende uno o más aislados fúngicos, un agente de biocontrol, o una composición de biocontrol de la invención.

Los aislados fúngicos, o combinaciones de los mismos, que se pueden emplear para controlar el crecimiento de malezas incluyen pero no están limitados a aquellos listados en la Tabla 1 de adelante.

ES 2 347 867 T3

TABLA 1

Formación de aislados fúngicos y malezas blanco afectadas

Aislado fúngico	Maleza blanco	Información de depósito
95-54A1	Cardo canadiense, Zanilla inodora, Amor de hortelano, Cerastio, Correhuela, Diente de león, Plátano, Girasol de la pradera	IDAC 230201-5*
97-12B	Cardo canadiense, Diente de león, Zanilla inodora, Amor de hortelano, Coquillo perenne, Cerastio	IDAC 230201-6*
97-15B2	Cardo canadiense, Zanilla inodora, Amor de hortelano, Cerastio, Trigo sarraceno, Girasol de la pradera	IDAC 110401-4**
94-359A	Zanilla inodora, Cardo canadiense, Diente de león,	IDAC 110401-2**
89-25A	Cardo canadiense, Zanilla inodora, Diente de león, Girasol de la pradera	IDAC 110401-1**
85-24B	Cardo canadiense, Diente de león, Zanilla inodora, Amor de hortelano, Girasol de la pradera, Cerastio, Plátano, Trigo sarraceno	IDAC 230201-1*
94-26	Cardo canadiense, Diente de león, Zanilla inodora, Amor de hortelano, Coquillo perenne, Cerastio, Plátano, Trigo sarraceno	IDAC 230201-2*
94-44B	Cardo canadiense, Diente de león, Zanilla inodora, Amor de hortelano, Coquillo perenne, Cerastio, Trigo sarraceno, Plátano, Girasol de la pradera,	IDAC 230201-3*
94-134	Cardo canadiense, Cerastio, Trigo sarraceno, Zanilla inodora, Plátano, Amor de hortelano	IDAC 230201-4*
95-268B	Amor de hortelano, Cerastio, Trigo sarraceno, Zanilla inodora, Cardo canadiense, Diente de león,	IDAC 110401-3**

* depositada Febrero 23, 2001 en la Autoridad de Deposito Internacional del Canadá (IDAC)

**depositada Abril 11, 2001 en la Autoridad de Deposito Internacional del Canadá (IDAC)

Con relación ahora a la Tabla 2 (y ver Ejemplo 2 para protocolos asociados) se muestra, como un ejemplo, actividad de control de maleza, como se indica mediante reducción de un peso fresco foliar, reducción en el peso de la raíz, clorosis, o mortalidad, en el cardo del Canadá por un rango de aislados fúngicos.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 347 867 T3

TABLA 2

Efecto de los aislados fúngicos sobre el peso fresco foliar (FFW), peso de raíz (RW), mortalidad (M) e incidencia de la clorosis (IOC) sobre plantas de cardo del Canadá, e índice de control de malezas asociados (WCIP)

Aislados	%FFW*	%RW*	%M	%IOC	WCIP**
Control	100±4	100±5	1±1	0	0
85-24B	22±6	25±4	57±7	86±6	74
94-26	23±7	26±6	72±7	83±6	76
94-44B	8±3	15±2	80±5	96±2	88
94-134	20±8	26±5	59±11	74±9	72
95-54A1	20±10	23±8	79±8	82±8	79
97-12B	59±13	53±11	39±11	61±11	47
89-25A	76±13	63±11	23±8	36±10	30
94-359A	69±13	63±10	18±9	43±13	32
95-268B	31±7	32±6	58±8	75±7	68
97-15B2	17±4	17±4	81±8	89±6	85

*% de Control

**WCIP = $\{[(100-RW) + (100-FFW) + (\%M) + (\%IOC)] / 400\} \times 100\%$

De la Tabla 2, se puede notar que varias cepas fúngicas, por ejemplo pero no limitadas a 85-24B, 94-26, 94-44B, 94-134, 95-54A1, 97-12B, 95-268B y 97-15B2 son capaces de reducir el peso fresco foliar en cardo del Canadá desde aproximadamente 40% a aproximadamente 92%, y suprimir el peso de raíz en aproximadamente 47% a aproximadamente 85% comparado con el control inoculado. Estos aislados fúngicos se caracterizan por tener un WCIP de aproximadamente 47 a 88% y ellos son efectivos para controlar el crecimiento de malezas que está soportado por la observación de que hasta aproximadamente 80% de las plantas se mueven por el tratamiento. Los aislados fúngicos 82-25A y 94-359A también son efectivos al suprimir el peso fresco foliar. El peso de la raíz, y exhibir un WCIP de aproximadamente 30-32%.

Por lo tanto, la presente invención se dirige a un bioherbicida que comprende aislados fúngicos 85-24B, 94-26, 94-44B, 94-134, 95-54A1, 97-12B, 89-25A, 94-359A, 95-268B y 97-15B2, o una combinación de los mismos para el control de cardo del Canadá.

Con relación ahora a la Figura 1, se muestra el efecto de una suspensión de inóculo que comprende el aislado fúngico 85-24B sobre el cardo del Canadá. La Figura demuestra que el daño del cardo del Canadá fue mayor a niveles de inóculos mayores. Una dosis en el rango de aproximadamente 5 g/0.01 m² a aproximadamente 50 g/0.01 m² o mayor es capaz de controlar el cardo del Canadá. También se observan resultados similares al aplicar gránulos de grano de cebada infestado a suelo.

Sin querer estar ligado por la teoría, los aislados fúngicos como se describen aquí pueden tener la capacidad de debilitar el cardo del Canadá, o un rango de otras malezas perennes o anuales, como se describe adelante, al afectar los procesos involucrados en el crecimiento de la planta y en el desarrollo, por ejemplo la fotosíntesis, la acumulación de productos de almacenamiento en las raíces, reducir la emergencia de brotes, reducir el crecimiento de la raíz, inducir síntomas de clorosis (amarillamiento de las hojas de la planta).

La caracterización de la actividad del control de maleza de varios aislados fúngicos de la presente invención indica que la actividad de control de la maleza de un aislado fúngico puede durar aproximadamente una estación de crecimiento, dependiendo del tiempo de aplicación del aislado fúngico al suelo o planta. Con referencia a la Tabla 18 (Ejemplo 3), se muestra que la aplicación en primavera o verano del aislado fúngico exhibe actividad de control de maleza sobre una o más de las estaciones de crecimiento. La aplicación de otoño da como resultado una actividad de control de maleza no observada. Adicionalmente, como se muestra en la Tabla 19 (Ejemplo 3), la actividad del control de la maleza incrementa con el mayor contenido de humedad del suelo.

Un número de aislados fúngicos también fueron probados para determinar su eficacia al controlar las malezas diferentes del cardo de Canadá, por ejemplo: miembros de la familia Asteraceae incluyendo *Sonchus arvensis* (cardosembra perenne) *Helianthus* (girasol de la pradera), *Taraxacum officinale* (diente de león) *Matricaria perforata* (Zanilla inodora), y otras plantas, incluyendo males de pollo (*Stellaria media*), avenas silvestres, cola de zorro verde y claveles falsos (*Gallium Spurium*).

ES 2 347 867 T3

Los aislados fúngicos 85-24B, 89-25A, 94-26, 94-359A, 94-44B, 94-134, 95-54A1, 95-268B, 97-15B2, y 97-15B2, 94-44B, 89-25A, 94-26, 95-54A1 y 97-12B, se aplicaron a cardo de siembra perenne utilizando el bio-ensayo de esterilla de inóculo descrito en el Ejemplo 2. Como se muestra en la Figura 2, los aislados fúngicos 94-44B, 94-26, 95-54A1, y 97-12B redujeron el peso de las raíces comparadas con el control inoculado en ensayos de invernadero.

Una reducción similar en el peso de la raíz también se observó con la mayoría de los otros aislados fúngicos como se indicó en la Tabla 8 de Ejemplo 2. Además, el aislado fúngico 94-44B reduce significativamente la biomasa foliar (Figura 3) y redujo la emergencia de retoños (Figura 4) con relación al control. Tres aislados (94-44B, 89-25A, Y 97-12B) incrementaron la mortalidad de las malezas como se muestra en la Figura 5 y la Tabla 8.

Por lo tanto, los aislados fúngicos 94-44B, 89-25A, 94-26, 95-54A1, Y 97-12B se pueden utilizar para controlar el cardo siembra perenne (*Sonchus arvensis*). En una realización preferida, en el lado fúngico, o la composición de biocontrol que comprende el 94-44B, se utiliza para controlar cardo siembra perenne.

Se han observado resultados similares del efecto de estos aislados fúngicos sobre otras malezas, tanto malezas perennes como anuales, como se demostró al determinar el WCI para un rango de especies de malezas, por ejemplo como se muestra en la Tabla 3 (también ver Ejemplo 2).

TABLA 3

Índice de control de maleza (WCI) de los aislados fúngicos sobre chamomil en aroma (SC), claveles falsos (FC), girasol de la pradera (SF), cerastio (CH), alforfón silvestre (WB), maleza ligada de campo (FB), cardo siembra perenne (PST), diente de león (DA), y cardo del Canadá (CT)

Aislado	SC*	FC*	SF*	CH*	WB*	FB*	PST**	DA**	CT**
No.	7	4	0	0	0	3	0.1	0	0
Sin hongos									
85-24B	79	30	84	76	92	nd	7	62	74
94-26	27	48	nd	91	39	nd	24	47	76
94-44B	82	64	69	99	96	nd	58	59	88
94-134	82	54	6	59	85	nd	8	15	72
95-54A1	98	54	72	59	85	nd	8	15	72
97-12B	93	43	9	7	15	nd	34	61	47
89-25A	71	13	70	nd	13	nd	15	43	30
94-359A	50	18	3	nd	17	13	6	25	32
95-268B	72	92	0	97	81	nd	0	45	68
97-15B2	91	72	53	65	55	nd	7	9	85

nd = no determinado

*WCIA(%) = $\{[(100-FFW) + (M) + (\%IOC)] O300\} \times 100\%$

**WCIP (%) = $\{[(100-RW) + (100-FFW) + (\%M) + (\%IOC)] O400\} \times 100\%$

Por lo tanto, la presente invención también está dirigida a un bioherbicida que comprende aislados fúngicos 85-24B, 94-26, 94-44B, 94-134, 95-54A1, 97-12B, 89-25A, 94-359A, 95-268B, 97-15B2, o una combinación de los mismos, para el control de cualquier maleza susceptible, tanto anual como perenne. Preferiblemente la maleza es una maleza de hoja ancha. Más preferiblemente, la maleza de hoja ancha es de Compositae, Caryophyllaceae, Polygonaceae, Plantaginaceae, Rubiaceae, o Convolvulaceae, por ejemplo pero no limitadas a, chamomile sin aroma, claveles falsos, cerastio, alforfón silvestre, maleza ligada de campo, cardo siembra perenne, diente de león y cardo del Canadá.

Utilizando el bio-ensayo de esterilla de inóculo (método subrayado en el Ejemplo 2), se probaron un número de aislados fúngicos por su capacidad de controlar las malezas de girasol (*Helianthus*). La germinación de semillas se afectó por los aislados fúngicos 85-24B, que redujeron la germinación de semillas de girasol en aproximadamente 10%. Cinco aislados fúngicos (85-24B, 94-44B, 89-25S, 95-54A1, 97-15B2) redujeron la biomasa foliar en el girasol de la pradera (ver también Tabla 10 (B), Ejemplo 2). Así, los aislados fúngicos 85-24B, 94-44B, 89-25A, 95-54A1, 97-15B2) se pueden utilizar para controlar el girasol de pradera.

También se observó que estos aislados fúngicos y las composiciones de biocontrol que comprenden los aislados fúngicos de la presente invención son específicas para un grupo objetivo de plantas y malezas, por ejemplo, aquellas de la familia Asterácea, (compositae). En general, los aislados fúngicos de la presente invención no fueron efectivos para controlar el crecimiento de pastos, por ejemplo, avena silvestre, y cola de zorro verde (ver Tabla 12 y 13, respectivamente). Sin embargo, el 94-44B exhibe actividad de control de maleza en avena silvestre, y 85-24B y 95-39A exhibe actividad de control de maleza en cola de zorro verde (ver Tabla 17, Ejemplo 2 para resumen del WCI).

Los aislados fúngicos de la presente invención también exhiben selectividad por que, aún bajo cargas de inóculo alta (significativamente mayores que aquellas utilizadas bajo condiciones de campo), los aislados se pueden identificar por que inducen síntomas despreciables o ningún síntoma de enfermedad en plantas de cultivo (ver Tablas 22 y 23, Ejemplo 4). Ejemplo de plantas de cultivo probadas incluyen:

1) Cereal y otros monocotiledones

Trigo - cvs. Katepwa, AC Domain, AC Karma, Biggar, Kile

Cebada - cvs. Harrington, Silky

Avena - cvs, Derby o Walden

Mijo - cvs, Minco o Prairie Gold

Semilla de Canary - cv. Keet

2) Cultivos con semilla de aceite

Canola cvs. Ac Excel, AC Parkland

Mostaza - cvs. Cutlas, Ochre

Lino - cv. Vimy

Girasol - cvs. Cargill SF270 o IS7111

Azafrán - CV. Lethbridge

3) Cultivos de legumbre

Lenteja - cvs. Laird, Eston

Arveja de campo - c.v Express

Arveja de pollo - cv. Sanford

Frijol Faba - cv. CDC Fatima

4) Cultivos de Forraje

Trébol - trébol amarillo cv. Norgold, trébol blanco cvs. Polara y Sonja, trébol común,

Trébol rojo cvs. Altaswede o Florex

Trihoja pie de pájaro - cv. Cree

Alfalfa - cv. Beaver.

Por ejemplo, lo que no debe considerarse limitante de ninguna manera el 94-44B es adecuado para uso con cultivos de cereal, y aún bajo cargas de inóculo altas sin que se observe síntomas de enfermedad. Sin embargo, el uso de 94-44B bajo cargas de inóculo altas pueden no ser deseadas para uso sobre cultivos de pulso, como en la medida en que los cultivos de pulso exhiban algunos síntomas de enfermedad bajo estas condiciones. Si las cargas de inóculo

inferiores de 94-44B se utilizan, entonces los síntomas de la enfermedad en legumbres se minimizan y este aislado se puede utilizar con cultivos de legumbres. En cargas de inóculo reducidas, estos aislados exhiben aún actividad de control de maleza. Un experto en la técnica puede manipular las dosis para optimizar el balance entre obtener actividad de control de maleza y evitar los síntomas de enfermedad en un cultivo no blanco planta agrícola o comercialmente importante.

También se contempla por medio de la presente invención el uso de un cardo inoculado, o un extracto de uno o más aislados fúngicos de la presente invención como un agente de control de maleza. Como se describió en el Ejemplo 5, el cardo inoculado (que incluye un cardo inoculado concentrado), extractos acuosos o disolvente, obtenidos de uno más aislados fúngicos como se describió aquí y reconstituidos en un medio apropiado, por ejemplo, pero no limitados a agua o metanol, se pueden aplicar al suelo o la hoja de una planta y exhibir actividad de control de maleza. También se contempla que un cardo inoculado, o un extracto de la presente invención se pueda combinar con un herbicida químico o un aislado fúngico, incluyendo aislados no *Phoma* como un agente de control de maleza.

También se contempla por medio de la presente invención un método que utiliza uno o más de un aislado de *Phoma macrostoma* unos extractos de los mismos, o combinaciones de ellos para controlar el desarrollo de malezas durante el crecimiento de un cultivo establecido, por ejemplo, como se alistó anteriormente e incluyendo pero no estando limitado a pasto, tal como pero no limitado a pastos especialmente de césped, pasturas de animales o mezclas de heno que comprenden uno o más de timoti, festuja, pasto azul, cizaña perenne, bromo, pasto canario, pasto superior rojo y de huerto, como se ilustró, por ejemplo, en la Tabla 18A (Ejemplo 3).

Se describe aquí un método que utiliza uno o más de un aislado de *Phoma cf macrostoma* como un extracto del mismo, un cardo inoculado de éste o una combinación del mismo para mejorar el crecimiento (por ejemplo incrementar la biomasa) de un cultivo que se está estableciendo o establecido, por ejemplo, como se listó anteriormente, y que incluye, pero no está limitado a un pasto, tal como, pero no limitado a pastos domésticos y especialmente de césped, pastura de animal o mezcla de heno que comprende uno o más de timote, festuja, pasto azul, cizaña perenne, bromo, pasto canario, pasto superior rojo y de huerto, como se ilustró, por ejemplo, en las Tablas 18A (Ejemplo 3), 21(C) y 21(D) (Ejemplo 3). Sin querer estar ligado por la teoría, el mejoramiento del crecimiento puede resultar en un incremento de la tasa de germinación.

También se contempla por medio de la presente invención un método que utiliza uno o más de un aislado de *Phoma cf macrostoma*, un extracto del mismo, o una combinación de estos para controlar el desarrollo de malezas durante el crecimiento de un cultivo en el que se ha establecido mediante la aplicación de rociado foliar antes o después de la emergencia de la maleza. El cultivo puede ser, por ejemplo, uno de los cultivos listados anteriormente, el que incluye pero no está limitado a un pasto, tal como, pero no limitado a pastos domésticos y especialmente de césped, pastura de animal o mezclas de heno que comprenden uno o más de timote, festuja, pasto azul, cizaña perenne, bromo, pasto canario, pasto superior rojo y de huerto, como se ilustró, por ejemplo, en la Tabla 21(D) (Ejemplo 3).

La aplicación de un cardo inoculado, o un extracto de la presente invención, cuando se combinó con un aislado fúngico, ejerce actividad de control de semilla de manera rápida, cuando se compara con la aplicación de un aislado por sí mismo. Sin querer estar ligado por la teoría, el cardo inoculado, o el extracto es capaz de funcionar de una manera más rápida, en razón de que no hay requisito de crecimiento del aislado fúngico, y la producción asociada de uno o más compuestos del aislado fúngico de crecimiento antes de notar la actividad de control de maleza. Tal aplicación combinada suministra una actividad de control de maleza rápida y más consistente durante el periodo de exposición de una planta al extracto - aislado o una mezcla de cardo -aislada inoculada.

La presente invención también contempla el uso de un aislado fúngico o cualquier combinación de aislados fúngicos con uno o más herbicidas químicos. Además, la presente invención contempla las composiciones de biocontrol que comprenden un aislado fúngico de la presente invención, o una pluralidad de aislados fúngicos con uno o más herbicidas químicos y un medio de crecimiento para soportar la viabilidad de los aislados fúngicos. La presente invención también comprende el uso de un estado fúngico o una combinación de los aislados fúngicos con una o más cepas fúngicas no *Phoma*. Además, la presente invención contempla las composiciones de biocontrol que comprenden un aislado fúngico de la presente invención, a una pluralidad de aislados fúngicos no *Phoma* con uno o más herbicidas y un medio de crecimiento para soportar la viabilidad de los aislados fúngicos.

La anterior descripción no pretende limitar la invención reivindicada de ninguna manera adicionalmente, la combinación discutida de características podría no ser absolutamente necesaria para la solución inventiva.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos.

Sin embargo se debe entender que estos ejemplos son solo con propósitos ilustrativos, y no deben ser utilizados para limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Aislamiento, almacenamiento y crecimiento de aislados fúngicos

Aislados Fúngicos

10 Las cepas fúngicas fueron inoculadas de lesiones cloróticas y necróticas pequeñas sobre los tejidos de hoja y tallo de las plantas de cardo de Canadá conectadas de los capos, pasturas, lados de camino. El aislado fúngico purificado de los tejidos de la planta se verificó por que originaba síntomas de enfermedad utilizando las pústulas de Koch.

15 TABLA 4

Información de hongos aislados de cardo del Canadá

20	Nombre	Ubicación	Habitat	Etapas de crecimiento de huésped	Síntomas originales
25	85-24B	Erwood, SK	No registrado	FloreCIMIENTO	Manchas de hojas, clorosis
	94-26	Chatham, ON	Lado de camino	Vegetativo	Clorosis
30	94-44B	Melfort, SK	Lado de camino	separación	Clorosis
	94-134	St. Quentin, NB	Campo de desperdicio	separación	clorosis
35	95-584A1	Coldbrook, NS	Pastura	Separación, florecimiento	Necrosis foliar
	97-12B	Valleyview, AB	Campo de barbecho	FloreCIMIENTO	Lesión de tallo
40	89-25A	Ituna, SK	Campo de cultivo	Vegetativo	Manchas de hoja
	94-359A	RM 157, SK	Campo de cebada	Establecimiento de semilla	Mancha de hoja
45	95-268B	Rosthern, SK	Campo de cultivo	FloreCIMIENTO	Lesión de tallo
	97-15B2	Westlock, AB	pastura	FloreCIMIENTO	Mancha de hoja, lesión de tallo

50 *Aislamiento de aislados fúngicos*

55 Los aislados fúngicos, obtenidos como se subrayó anteriormente son esterilizados en superficie durante 2 minutos en 0.5% de hipoclorito de sodio, enjuagado en agua destilada estéril, y colocado en Difco PDA (Agar de Dextroza de Papa) placas a 24°C durante 12 horas de luz, durante 3-7 días. Los hongos que crecen de los tejidos son transferidos individualmente a medio fresco y se les permite crecer hasta maduración. Los aislados son tamizados para patogenizidad utilizando las pústulas de Koch con un bio-ensayo de hoja separada. Las hojas recientemente cortadas de cardo del Canadá son esterilizadas en la superficie y colocadas sobre un papel de filtro #3 Whatman húmedo en una caja petrie de vidrio. Un tapón de Agar de cultivo de hongo purificado se colocó en el centro de cada hoja, el disco se selló para evitar la pérdida de humedad, y se incubó como se describió anteriormente. Se observó desarrollo de los síntomas de enfermedad. Copias múltiples de cultivos patogénicos purificados se colocan en almacenamiento de criopreservación como se subrayó adelante.

65 Los cultivos de hongos purificados se almacenan mediante criopreservación de esporas y micélicos a menos 78°C utilizando una humedad 1:1 de 10% de leche descremada (p/v) a 40% de soluciones de glicerol (v/v).

ES 2 347 867 T3

Los siguientes 10 cultivos de hongos se identificaron mediante CBS, Holanda como *Phoma cf. macrostoma* Montagne, se depositaron en el IDAC como sigue:

- 85-24B (IDAC 230201-1, depositado Febrero 23, 2001)
- 89-25A (IDAC 110401-1, depositado Abril 11, 2001)
- 94-26 (IDAC 230201-2, depositado Febrero 23, 2001)
- 94-44B (IDAC 230201-3, depositado Febrero 23, 2001)
- 94-134 (IDAC 230201-4, depositado Febrero 23, 2001)
- 94-359A (IDAC 110401-2, depositado Abril 11, 2001)
- 95-54A1 (IDAC 230201-5 depositado Febrero 23, 2001)
- 95-268B (IDAC 110401-3 depositado Abril 11, 2001)
- 97-12B (IDAC 230201-6 depositado Febrero 23, 2001)
- 97-15B2 (IDAC 110401-4, depositado Abril 11, 2001)

Cultivar y almacenar aislados fúngicos

Recipientes que contienen 125 mL de Cardo de Dextrosa de Papa (PDB) o un cardo de jugo V8® (Dhingra, O.D., and Sinclair, J. B. 1995.) Basic Plant Pathology Methods, Second Edition, CRC Press Inc., Boca Raton, F.L.)

Con 1×10^5 cunidios/L y se incubaron sobre un agitador (150 rpm) bajo condiciones ambiente (20°C) durante un mínimo de 7-14 días, pero más preferiblemente durante 14-28 días. Los contenidos de cada recipiente son entonces filtrados al vacío para separar las esporas y el micelio. Se midió la concentración de conidio del peso fresco del micelio.

Los hongos pueden crecer sobre medio sólido o líquido. Para el cultivo en un medio sólido, todos los hongos aislados crecen en un Agar de Dextrosa de Papa Difco (PDA; preparado de acuerdo con las directrices del fabricante) aumentado con 3 ml de 85% de ácido láctico por litro de medio. Un frasco de cultivo de hongos tomado de crio-preservación es descongelado a temperatura ambiente y los contenidos son distribuidos asépticamente al pipetear los contenidos sobre 3 o más placas preparadas. El inóculo se regó sobre la superficie de cada placa utilizando una barra de jockey de vidrio estéril. Las placas de gas se incuban sobre una banca de laboratorio a temperatura ambiente una incubadora a 23/18°C durante 12 horas de luz (bulbos fluorescentes blancos fríos 20 W) durante una a dos semanas.

Para un medio de cultivo líquido, 125 ml de PDB Difco se coloca en un Erlenmeyer de 500 ml. El recipiente se inocula con una suspensión de esporas tapones de agar. Para la suspensión de esporas, se hizo fluir una placa Difco madura con agua destilada de estéril y las esporas son separadas suavemente con una barra de jockey de virio estéril. La suspensión de espóra se diluyó hasta una concentración de 1×10^6 esporas/ml y luego 1 ml de solución de esporas diluidas se agregó a cada recipiente de medio líquido. Para inocular el medio líquido con tapones de agar, se toman tapones de agar con un diámetro de 5-8 mm de un cultivo maduro sobre una placa PDA Difco. En los recipientes inoculados se incuban sobre un agitador superior de banca a 150 rpm durante 2 semanas a luz ambiente y condiciones de temperatura.

Los micelios (10 g) de los cultivos líquidos se colocan e 20 ml de leche descremada a 5%: 20% de solución de criopreservación de glicerol y homogenizada. Las muestras se congelan y almacenan a -18°C y a -73°C durante 30 días y se comparan a un control preparado inmediatamente después de homogenización. Luego del almacenamiento durante 30 días, se determina la viabilidad al regar 500 μ l de suspensión sobre una placa de la mitad de concentración de PDA, incubar durante 4 días, y evaluar el crecimiento de micelios y la producción de conidios. Como un ejemplo, no hubo pérdida viabilidad del aislado de hongos 85-24B crecido en PDB sobre un cardo de jugo V8® después de almacenamiento a -18°C o -73°C durante un periodo de 1 mes.

Ejemplo 2

Control de crecimiento de malezas utilizando aislados fúngicos

Efecto de la dosis sobre el control de maleza

Los aislados fúngicos crecen sobre PDA ácido láctico durante 10 a 14 días. Las placas de agar cultivadas con hongos son pesadas en dosis de 50 g (equivalente a una placa de agar completa). 10 g, 5 g, 2,5 g, y 0 g (control) luego

ES 2 347 867 T3

macerados con agua destilada estéril y cada dosis de la suspensión de inóculo es llevada a un volumen final de 50 ml. Como un ejemplo, se probó el 85-24B.

Las raíces son cortadas en longitudes apropiadas, por ejemplo raíces del cardo de Canadá son de 10 cm de longitud, pesadas y colocadas en ollas cuadradas de 10 cm rellenas con suelo. Una dosis de la suspensión de inóculo es vertida sobre la superficie de las raíces cubiertas con 1 cm de suelo, puesta con agua a saturación y colocada en un invernadero (20°C DÍA, 15°C noche, 16 luz de día) con 6 replicas. Las plantas son calificadas por la emergencia del brote, la clorosis y la muerte a las 2, 4 y 6 semanas. A las 6 semanas las raíces son cosechadas y pesadas. Los resultados de este estudio utilizando aislado 85-24B son presentadas en la Figura 1 (la escala de calificación es 1 = saludable, follaje verde oscuro; 2 = follaje ligeramente amarillo-verde; 3= hojas principalmente amarillas, algunas amarillas-verdes; 4 = hojas principalmente blancas, unas pocas amarillas-verde 5 = plantas completamente blancas; y 6 = plantas muertas).

Estos resultados demuestran que los aislados fúngicos de la presente invención pueden controlar el crecimiento de maleza y que este defecto es más prominente con cantidades crecientes de inóculo administrado a las raíces.

Bio-ensayo de esterilla de inóculo

Las raíces son lavadas durante 1 hora bajo agua de llave corriente para remover el exceso de suelo, y cortarlas en longitudes de 10 cm cada longitud con al menos una yema. El peso de 2-10 cm de longitudes de raíz, manteniendo los pesos de raíz similares para todas las ollas utilizadas en esta replica, se registran. A la placa de agar inoculada de dos semanas es invertida sobre las piezas de raíz. El control es una placa de agar que no se inóculo con un hongo. La placa de agar y las raíces están cubiertas con 2-3 cm de mezcla de suelo y las ollas colocadas en un invernadero a 20/15°C y luz natural.

El número total de brotes o plantas, el número de brotes o plantas que mueren, el número total de brotes o plantas con síntomas es decir (clorosis, necrosis, lesiones) a las 2, 4 y 6 semanas después de que es registrado el inóculo de la raíz. Después de 6 semanas, se toma la biomasa foliar y el peso de la raíz. Los datos se analizaron para varios parámetros:

- i) % crecimiento de raíz; [peso final de la raíz o tratamiento/inicio de peso de la raíz del tratamiento], o [peso de la raíz final o control/inicio de peso de la raíz del control] x100:
- ii) biomasa foliar
- iii) emergencia de la raíz, % de control; y
- iv) % de emergencia con síntomas.

El efecto de varios aislados fúngicos de la presente invención sobre el crecimiento de cardo de Canadá y el desarrollo se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

Efecto de la inoculación de raíz de aislados de Phoma sobre el desarrollo de la enfermedad del cardo de Canadá, ensayado utilizando biomasa de esterilla de inóculo

Aislado	Aplicación de Zona de Raíz		
	Clorosis (escala 1-6) ^z	Peso fresco foliar peso de (g)	RW (% de control)*
Experimento A			
Control	1a ^y	0.67a	100a
95-54A1	5b	0.24b	66a

ES 2 347 867 T3

Experimento B			
Control	1a	2.6a	100 a
97-12B	6b	0.0b	14b
Experimento C			
Control	1a	49.1 a	100 a
89-25A	4 c	17.0 c	29 c
94-359A	1a	44.8 ab	70 b
97-15B2	3 b	35.8 ab	47 bc

*RW – peso de raíz;

^z escala de calificación de clorosis creciente iniciando 1 = verde, saludable a 6 = blanco, huerto.

^y diferentes letras dentro de la columna para cada experimento indican diferencias significativas en $P < 0.05$ utilizando la Prueba de Rango Múltiple de Duncan

Los resultados en la Tabla 5 demuestran que los aislados fueron efectivos en la actividad de control de malezas, por ejemplo controlar el crecimiento y desarrollo de cardo de Canadá, cuando se aplicó al suelo.

A) Comparación de las Cepas Fúngicas para el Control de Cardo de Canadá

Utilizando e bio-ensayo de esterilla de inóculo, un rango de aislados fúngicos se probó para la actividad de control de malezas utilizando el cardo de Canadá como una maleza.

Los resultados utilizando el bio-ensayo anterior, sobre el efecto de varios aislados fúngicos sobre el crecimiento de cardo de Canadá y el desarrollo se muestran e la Tabla 6.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 6. Comparación de aislados fúngicos y control no tratado para la reducción en peso de raíz, biomasa foliar, mortalidad, y expresión de síntomas de enfermedad en cardo de Canadá conducido en seis experimentos de invernadero

	Control	85-24B	94-26	94-44B	94-134	95.54AI	97-12B	89-25A	95-359A	95-268B	97-15B2
Peso de Raíz (% de control)											
Expt 1	100a*	41 b	84a	18b	nt**	nt	68ab	73a	85a	51ab	nt
Expt 2	100a	33 cd	8d	11d	nt	nt	53 bc	34 cd	28 cd	46 c	nt
Expt 3	100 a	23 b	19 b	16b	nt	nt	37b	83 a	77 a	23 b	nt
Expt 4	100 a	6b	10 b	12 b	28 b	8 b	nt	nt	nt	17b	14b
Expt 5	100 a	30 b	24 b	26 b	32 b	16 b	nt	nt	nt	42 b	20 b
Expt 6	100 a	13 c	12 c	9 c	17 c	46 b	nt	nt	nt	14c	17c
Media	100 ± 3	25 ± 4	26 ± 6	15 ± 2	26 ± 5	23 ± 8	53 ± 11	63 ± 11	63 ± 10	32 ± 6	17 ± 4
Peso Fresco Foliar (g)											
Expt 1	5.2 ab	2.2 c	5.3 ab	0.5e	nt	nt	4.7 ab	4.1b	4.8 ab	2.4 c	nt
Expt 2	4.1 a	1.4 cde	0.2 e	0.1e	nt	nt	2.4 bc	1.7 cde	0.8 de	1.8 cd	nt
Expt 3	3.0 a	1.1 b	0.4 b	0.1 b	nt	nt	0.9 b	3.2 a	2.8 a	0.6 b	nt
Expt 4	11.8 a	0 c	0c	0c	4.4 b	0.2 c	nt	nt	nt	2.3 bc	1.4 bc
Expt 5	8.6 a	0.7 b	0.8 b	2.4 b	1.6 b	0.3 b	nt	nt	nt	3.5 b	1.1 b
Expt 6	11.1 a	0.5 c	0.8 c	0.7 c	0.4 c	5.9 b	nt	nt	nt	1.8 c	1.7 c
Media	7.2 ±	1.0 ±	1.3 ±	0.6 ±	2.1 ±	2.2 ±	2.7 ±	3.0 ±	2.8 ±	2.0 ±	1.4 ±

65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15 10 5

Mortalidad											
Expt 1	0	20 bc	0	38 c	nt	nt	7 ab	8 ab	10 ab	27 bc	nt
Expt 2	5a	40 b	95 c	100 c	nt	nt	39 b	50 b	45 b	27 ab	nt
Expt 3	0	40 b	78 c	85 c	nt	nt	39 b	50 b	45 b	27 ab	nt
Expt 4	0	92 bc	100 c	100 c	60 b	92 bc	nt	nt	nt	88 c	87 bc
Expt 5	0	72 d	78 d	78 d	40 bc	90 d	nt	nt	nt	64 cd	73 d
Expt 6	2a	84 c	82 c	90 c	77 c	55 bc	nt	nt	nt	80 c	83 c
Media	1 ± 1	57 ± 7	72 ± 7	80 ± 5	59 ± 11	79 ± 8	39 ± 11	23 ± 8	18 ± 9	58 ± 8	81 ± 8

Síntomas de Enfermedad (% de brotes con clorosis)											
Expt 1	0	87 b	23a	100 b	nt	nt	33 a	32 a	20 a	70 b	nt
Expt 2	0	80 bc	95 c	100 c	nt	nt	70 bc	50 b	100 c	63 b	nt
Expt 3	0	67 b	90 bc	100 c	nt	nt	80 bc	25 a	10a	85 bc	nt
Expt 4	0	100 c	100 c	100 c	60 b	96 c	nt	nt	nt	88 c	87 c
Expt 5	0	100 c	88 bc	78 bc	73 bc	100 c	nt	nt	nt	68 b	90 bc
Expt 6	0	88 c	100 c	100 c	90 c	49 b	nt	nt	nt	80 c	90 c
Media	0 ± 0	86 ± 6	83 ± 6	96 ± 2	74 ± 9	82 ± 8	61 ± 11	36 ± 10	43 ± 13	75 ± 7	89 ± 6

* Para cada experimento, letras diferentes en una fila indican diferencias significativas entre los aislados y el control mediante la prueba de rango múltiple de Duncan en P < 0.1.
** nt – no probado.

ES 2 347 867 T3

Estos resultados demuestran que un rango de aislados de Foma tienen un impacto negativo sobre el peso de la raíz, el peso fresco foliar, la clorosis, y la mortalidad en el cardo de Canadá, y se pueden utilizar para controlar el crecimiento y desarrollo de cardo de Canadá.

- 5 Los resultados anteriores se promedian (Tabla 7). Estos resultados indican que un rango de aislados fúngicos exhibe actividad de control de malezas, en que el WCIP es mayor de 20%.

TABLA 7

10 *Comparación de 10 cepas fúngicas para control de cardo de Canadá utilizando el bio-ensayo de esterilla de inóculo. Las medias y el error estándar calculados de los datos recolectados en 3-6 ensayos, cada ensayo con 5 réplicas*

15	Tratamiento	RW* % de control	FFW % de control	Mortalidad %	IOC %	WCIP %
	Control	100 ± 5	100 ± 4	1 ± 1	0 ± 0	0
20	85-24B	25 ± 4	22 ± 6	57 ± 7	86 ± 6	74
	94-26	26 ± 6	23 ± 7	72 ± 7	83 ± 6	76
	94-44B	15 ± 2	8 ± 3	80 ± 5	96 ± 2	88
25	94-134	26 ± 5	20 ± 8	59 ± 11	74 ± 9	72
	95-54A1	23 ± 8	20 ± 10	79 ± 8	82 ± 8	79
	97-12B	53 ± 11	59 ± 13	39 ± 11	61 ± 11	47
30	89-25A	63 ± 11	76 ± 13	23 ± 8	36 ± 10	30
	94-359A	63 ± 10	69 ± 13	18 ± 9	43 ± 13	32
	95-268B	32 ± 6	31 ± 7	58 ± 8	75 ± 7	68
35	97-15B2	17 ± 4	13 ± 6	81 ± 8	89 ± 6	85
40	*RW – peso de la raíz; FFW – peso foliar fresco; IOC – incidencia de clorosis; WCIP – índice de control de maleza perenne (WCIP % = {[(100 – peso de raíz) + (100 – peso fresco foliar) + (% mortalidad) + (% incidencia de clorosis)] / 400} x 100%.)					

45 B) Comparación de la Actividad de Control de Maleza de Cepas Fúngicas en el Rango de Plantas

La actividad de control de maleza de un rango de aislados fúngicos sobre varias malezas anuales y perennes y otras plantas se examina utilizando el bio-ensayo de esterilla. Las plantas probadas son:

50	Cardo siembra perenne	Tabla 8
	Diente de León	Tabla 9
	Manzanilla sin aroma	Tabla 10(A)
55	Girasol de pradera	Tabla 10(B)
	Preseras falsas	Tabla 11
	Avenas Silvestres	Tabla 12
60	Cola de zorro verde	Tabla 13
	Cerastio	Tabla 14
	Trigo sarraceno silvestre	Tabla 15
	Maleza ligada de campo	Tabla 16
65	Plátano	Tabla 16A
	Resumen del WCI	Tabla 17

ES 2 347 867 T3

En las Tablas 8-17, se utilizan los siguientes acronimos:

RW - peso de raíz;

FFW - peso fresco de foliar;

IOC - incidencia de clorosis;

WCIP - índice de control de maleza perenne (WCIP % = $\{[(100 - \text{peso de raíz}) + (100 - \text{peso fresco foliar}) + (\% \text{ mortalidad}) + (\% \text{ incidencia de clorosis})]/400\} \times 100\%$.)

WCIA - índice de control de maleza anual (WCIA % = $\{[(100 - \text{peso fresco foliar}) + (\% \text{ mortalidad}) + (\% \text{ incidencia de clorosis})]/300\} \times 100\%$.)

S.E. Agrupado = error estándar agrupado medio entre aislados y control.

TABLA 8

Comparación de Cepas Fúngicas para control de cardo sembrado perenne

Aislado	RW (% de C)	FFW (% de C)	Mortalidad %	IOC %	WCIP %
Control (C)	100	100	3	0	0.1
85-24B	78	100	7	0	7
94-26	67	72	0	33	24
94-44B	22	20	33	40	58
94-134	68	100	0	0	8
95-54A1	67	100	10	10	13
97-12B	57	76	27	40	34
89-25A	92	87	20	17	15
94-359A	100	98	13	13	6
95-268B	100	100	0	0	0
97-15B2	72	100	0	0	7
S.E. Agrupado	12	14	4	6	

TABLA 9

Comparación de Cepas Fúngicas para control de Diente de León

Aislado	RW (% de C)	FFW (% de C)	Mortalidad %	IOC %	WCIP %
Control (C)	100	100	0	0	0
85-24B	55	17	19	100	62
94-26	63	50	12	90	47
94-44B	63	24	24	97	59
94-134	88	80	7	21	15
95-54A1	47	35	45	80	61
97-12B	48	21	35	78	61
89-25A	70	31	13	74	43
94-359A	73	66	15	38	25
95-268B	57	37	10	75	45
97-15B2	79	96	4	12	9
S.E. Agrupado	8	13	6	8	

ES 2 347 867 T3

TABLA 10(A)

Comparación de Cepas Fúngicas para control de Manzanilla sin Aroma

Aislado	FFW (% de C)	Mortalidad %	IOC %	WCIA %
Control (C)	100	12	8	7
85-24B	28	83	83	79
94-26	66	27	19	27
94-44B	15	86	75	82
94-134	16	83	80	82
95-54A1	0	100	94	98
97-12B	5	93	91	93
89-25A	26	81	60	71
94-359A	45	49	46	50
95-268B	18	67	67	72
97-15B2	14	91	95	91
S.E. Agrupado	15	15	14	

TABLA 10(B)

Comparación de Cepas Fúngicas para control de Girasol de la Pradera

Aislado	FFW (% de C)	Mortalidad %	IOC %	WCIA %
Control (C)	100	0	0	0
85-24B	19	85	88	84
94-26	nd	2	0	nd
94-44B	32	65	74	69
94-134	85	0	4	6
95-54A1	21	51	86	72
97-12B	100	11	15	9
89-25A	27	62	75	70
94-359A	100	0	8	3
95-268B	100	0	0	0
97-15B2	44	60	44	53
S.E. Agrupado	15	10	10	

ES 2 347 867 T3

TABLA 11

Comparación de Cepas Fúngicas para control de Preseras falsas

Aislado	FFW (% de C)	Mortalidad %	IOC %	WCIA %
Control (C)	100	12	0	4
85-24B	66	33	24	30
94-26	43	45	42	48
94-44B	35	65	63	64
94-134	42	63	40	54
95-54A	41	78	76	71
97-12B	48	45	31	43
89-25A	97	23	13	13
94-359A	90	29	14	18
95-268B	6	93	89	92
97-15B2	29	72	74	72
S.E. Agrupado	16	10	11	

TABLA 12

Comparación de Cepas Fúngicas para control de Avenas Silvestres

Aislado	FFW (% de C)	Mortalidad %	IOC %	WCIA %
Control (C)	100	0	0	0
85-24B	100	0	0	0
94-26	na	4	0	nd
94-44B	100	3	61	21
94-134	94	0	0	2
95-54A1	100	0	0	0
97-12B	100	0	0	0
89-25A	100	0	0	0
94-359A	100	0	0	0
95-268B	96	13	0	17
97-15B2	96	0	0	4
S.E. Agrupado	18	1	1	

ES 2 347 867 T3

TABLA 13

Comparación de Cepas Fúngicas para el control de Cola de Zorro verde

Aislado	FFW (% de C)	Mortalidad %	IOC %	WCIA %
Control (C)	100	3	0	1
85-24B	48	37	39	43
94-26	na	52	0	nd
94-44B	72	0	3	10
94-134	100	0	0	0
95-54A1	100	6	0	2
97-12B	95	18	0	8
89-25A	100	3	0	3
94-359A	50	36	43	43
95-268B	100	0	0	0
97-15B2	100	0	0	0
S.E. Agrupado	20	4	2	

TABLA 14

Efecto de los Aislados Fúngicos sobre el control de Cerastio

	Emergencia %	Clorosis %	FFW %	Mortalidad %	WCIA %
Control (C)	57	0	100	3	0
85-24B	55	73	15	70	76
94-134 ^z	65	34	29	70	91
94-26	45	87	1	88	99
94-44B	35	100	0	96	59
95-54A1	60	73	3	82	84
97-12B	36	50	18	40	57
95-268B	69	97	2	97	97
97-15B2	64	60	22	56	65
^z Media de Dos ensayos					

ES 2 347 867 T3

TABLA 15

Efecto de Aislados Fúngicos sobre el control de Trigo sarraceno silvestre

	Emergencia %	Clorosis %	FFW %	Mortalidad %	WCIA %
Control (C)	54	0	100	0	0
85-24B	41	88	1	91	92
94-134	32	87	5	74	39
94-26	40	22	32	28	96
94-44B	49	95	1	95	85
95-54A1	55	5	78	5	11
97-12B	40	4	61	0	15
89-25A	39	0	62	0	13
94-359A	41	0	49	0	17
95-268B	36	89	7	59	81
97-15B2	40	63	22	25	55

TABLA 16

Efecto de Aislados Fúngicos sobre el control de Maleza ligada de Campo

	Emergencia %	Clorosis %	FFW %	Mortalidad %	WCIA %
Control (C)	34	0	100	9	3
95-54A1	33	50	32	43	54
94-359A	37	0	75	13	13

TABLA 16A

*Efecto de Aislados Fúngicos sobre el control del Plátano (*Plantago lanceolata*)*

	Emergencia %	Clorosis %	Peso Fresco %	Mortalidad %	Índice de control de maleza %
Sin hongo	100	0	100	0	0
85-24B	91	98	0	100	100
94-134	96	100	0	98	98
94-26	100	100	0	100	100
94-44B	100	100	0	100	100
95-54A1	100	100	0	100	100
97-15B2	95	25	44	26	36

Índice de control de maleza anual % = [(100 – peso fresco foliar) + (% mortalidad) + (% incidencia de clorosis)] / 300 x 100%. Un índice de control de maleza mayor de 25% se consideró aceptable.

ES 2 347 867 T3

TABLA 17

Índice de control de maleza (WCI) de aislados fúngicos sobre Manzanilla sin aroma, preseras falsas, avenas silvestres, cola de zorro verde, cerastio, trigo sarraceno silvestre, maleza ligada de campo, plátano, cardo sembrado perenne, diente de león, y cardo de Canadá. Un índice de control de maleza mayor del 25% se consideró aceptable

Aislado	Índice de control de Maleza %											Resumen de los Niveles de Bioactividad	
	SC	FC	WO	GF	CH	WB	FB	PL	PS T	DA	CT	WCI preferido: 50-75%	WCI más preferido: 75-100%
Sin hongo	7	4	0	1	0	0	3	0	0.1	0	0	na	na
85-24B	79	30	0	43	76	92	nd	100	7	62	74	DA, CT	SC, CH, WB, PL
94-26	27	48	nd	nd	91	39	nd	100	24	47	76	ninguno	CH, CT, PL
94-44B	82	64	21	10	99	96	nd	100	58	59	88	FC, PST, DA	SC, CH, WB, CT PL
94-134	82	54	2	0	59	85	nd	98	8	15	72	FC, CH, CT	SC, WE PL
95-54A 1	98	71	0	2	84	11	54	100	13	61	79	FC, FB, DA	SC, CH, CT, PL
97-12B	93	43	0	8	57	15	nd	nd	34	61	47	CH, DA	SC
89-25A	71	13	0	3	nd	13	nd	nd	15	43	30	SC	ninguno
94-359A	50	18	0	43	nd	17	13	nd	6	25	32	SC	ninguno
95-268 B	72	92	17	0	97	81	nd	nd	0	45	68	SC, CT	FC, CH, WB
97-15B 2	91	72	4	0	65	55	nd	36	7	9	85	FC, CH, WB, SF	SC, CT

nd = sin datos; na = no aplicable.

Malezas anuales: SC = manzanilla sin aroma, WO = avenas silvestres, GF = cola de zorro verde, FC = Preseras falsas, CH = cerastio, WB = trigo sarraceno silvestre, FB = maleza ligada a campo, PL = semilla de plátano.

Índice de control de maleza anual % = $[(100 - \text{peso fresco foliar}) + (\% \text{ mortalidad}) + (\% \text{ incidencia de clorosis})] / 300 \times 100\%$

Malezas Perennes: PST = cardo sembrado perenne, DA = Diente de león, CT = cardo de Canadá.

Índice de control de maleza perenne % = $[(100 - \text{peso de raíz}) + (100 - \text{peso fresco foliar}) + (\% \text{ mortalidad}) + (\% \text{ incidencia de clorosis})] / 400 \times 100\%$.

Colectivamente estos resultados demuestran que un rango de aislados de Foma macrostoma, son efectivos al controlar selectivamente el crecimiento de malezas. Estos aislados son efectivos en controlar el crecimiento de malezas de hoja ancha, incluyendo la Plantaginaceae, por ejemplo, plátano, el Compositae, por ejemplo, manzanilla sin aroma, diente de león, cardo sembrado perenne, preseras falsas, y cardo de Canadá, Caryophyllaceae, por ejemplo cerastio,

Polygonaceae, por ejemplo maleza ligada de campo, Convolvulaceae, por ejemplo correhuela. La Foma macrostoma, no exhibe actividad de control de malezas de pastos, por ejemplo, avenas silvestres, y cola de zorro verde, y se puede utilizar por lo tanto para controlar malezas de hoja ancha en pastos.

5 Ejemplo 3

Caracterización de la Actividad de Control de Maleza

10 *Bio-ensayo de Cebada sin Cáscara*

Para preparar la cebada para inóculo con el aislado fúngico, cebada sin cáscara embebida, por ejemplo, pero no se limita a, cebada cv. CDC Silky en agua destilada. El agua de exceso drenada y sometida a autoclave durante 45 minutos a 121°C para un total de tres veces. Después del autoclave inocular los recipientes cuando ellos están fríos.

15 Para preparar la suspensión de inóculo, se coloca una placa de cultivo de agar de dos semanas en una botella de boca ancha, con agua destilada estéril, y una solución de almacenamiento de antibiótico (estreptomicina y vancomicina) se agrega y se homogeniza la mezcla de antibiótico de agar.

20 Inocular cada recipiente de granos de cebada estéril con una suspensión de inóculo homogenizada e incubar durante dos semanas bajo condiciones de laboratorio ambiente. Después de la incubación, remover la cebada del recipiente y regar los granos infectados en una capa delgada sobre una bandeja para secar durante 4 días bajo condiciones ambiente. Los granos secos se muelen con un molino (es decir, Arthur H. Thomas Co.). El inóculo molido se puede almacenar durante hasta 3 meses a temperatura ambiente o refrigerar durante un tiempo de almacenamiento mayor. El control
25 consiste de grano estéril inoculado tratado de la misma manera. La viabilidad del inóculo molido se determinó al plantar 25 piezas de placa PDA y registrar el número de partículas con crecimiento de colonia después de 3 días y el número de colonias que semeja el aislado fúngico original o son contaminantes después de 7 días.

Para conducir el bio-ensayo, se cortan raíces saludables en segmentos de longitud de 10 cm, estando seguro de que
30 cada segmento de raíz tiene al menos una yema. Los segmentos de raíz lavados se pesan y se colocan dos por olla. Inóculo molido espolvoreado homogéneamente sobre las raíces y la superficie del suelo, por ejemplo aproximadamente 5 g (otras dosis también se pueden utilizar), cubren con 2-3 cm de mezcla de suelo, y las ollas se colocan en un invernadero. Se registra el número total de brotes, número de brotes o plantas que mueren, número total de brotes o plantas con síntomas (es decir, clorosis, necrosis, lesiones) a las 2, 4 y 6 semanas después de la inoculación. También
35 a las 6 semanas se recolecta, enjuaga y registra el peso fresco de las raíces que permanecen en la olla y el peso fresco del tejido foliar. Los datos se analizan para varios parámetros:

- i) % crecimiento raíz (es decir, [peso de raíz final de tratamiento/inicio de peso de raíz de tratamiento] o [peso de raíz final de control/peso de control de raíz inicial] x 100);
- 40 ii) biomasa foliar;
- iii) emergencia de brote como % de control; y
- 45 iv) % de brotes con síntomas.

A) Duración de aplicación

Para determinar la eficacia de una aplicación única de aislados fúngicos de la presente invención sobre los años
50 subsecuentes, se aplicaron aislados fúngicos de muestra al suelo (inóculo de cebada sin cáscara preparado como se subrayó anteriormente) a una tasa de 1 kg/m² (sobre un rango de tamaños de partícula de 50-840 µ; ver Tabla 20 adelante), en tres periodos diferentes dentro de la estación de crecimiento: al final de la primavera (en el momento de la emergencia del cardo de Canadá); medio verano, y en el otoño. El número de cardo de Canadá que permanece en las gráficas de prueba se determinó sobre dos estaciones de crecimiento. Los resultados de este experimento se presentan
55 en la Tabla 18.

60

65

TABLA 18

El efecto de una aplicación única de aislado 85-24B al suelo sobre la emergencia de plantas de cardo de Canadá en el campo

Tratamiento	Número de plantas de cardo de Canadá por gráfica durante el tiempo				
	Agosto /99	Septiembre/ 99	Mayo /00	Junio /00	Julio/ 00
Control	45 ± 9	80 ± 12	43 ± 5	69 ± 6	114 ± 5
Aplicado Junio 1999	21 ± 1	44 ± 2	20 ± 2	42 ± 4	73 ± 4
Aplicado Agosto 1999	14 ± 5	39 ± 17	22 ± 6	41 ± 9	80 ± 14
Aplicado Octubre 1999	na	na	46 ± 9	82 ± 15	131 ± 21
na = no disponible					

Estos datos ilustran que una aplicación única del aislado fúngico de la presente invención es efectiva para ejercer actividad de control de malezas sobre una o más estaciones de crecimiento. La actividad de control de maleza es mayor si el inóculo se aplica en la primavera o el verano, y se reduce si se aplica en el otoño.

Actividad de Control de Maleza en Pastos

Para determinar la eficacia de una aplicación única de los aislados fúngicos de la presente invención para el control de maleza en el establecimiento de pastos de semilla o en césped perenne previamente establecido, se aplicaron aislados fúngicos de muestra en la primavera al suelo (inóculo de cebada sin cáscara preparado como se subrayó anteriormente) a una tasa entre 250-1000 g/m² (sobre un rango de tamaños de partícula de 50-840 µ; ver Tabla 20 adelante). Inóculo, semilla de pasto y semilla de maleza se pesaron antes de establecer las gráficas de campo. Una mezcla de pasto de césped "sobresembrado" se aplicó a 5.7 g por 1/4 m² (200 lb por acre). Este contenía 40% de Cizaña Perenne (Manhattan III y Calypso II), 25% de Pasto Azul de Kentucky (Quantum Leap y Alene), 15% de Festuja masticables, 10% de Festuja Rojo Crepado, 10% de Poa trivialis L. De esta cantidad un 10% de mezcla de maleza se calculó (5% de semilla de diente de león y 5% de semilla de cerastio) para ser 0.6 g por 1/4 m². Los aislados del inóculo se pesaron de acuerdo con la dosis aplicada. La preparación de la gráfica de campo del área de pasto sembrada consistió de rotoarar el suelo y luego empacar firmemente el lecho de semilla al colocar sobre una pieza de un m² de madera laminada. Las áreas que no son suaves, se rastrillaron y empacaron de nuevo. Las áreas de 1/4 de m² se establecieron en el centro del área empacada. La semilla de pasto, la semilla de maleza y el inóculo se espolvorearon sobre la parte superior y rastrillados a mano en dos direcciones. Luego longitudes de 5 m de la cubierta de hilera se colocaron sobre la parte superior de las áreas durante un período de 2 semanas y en este tiempo, las áreas se regaron con agua cada día, solo lo suficiente para mantener la humedad de la superficie y no permitir que la semilla de pasto se seque aunque germine. En césped previamente establecido, las áreas de 1/4 m² se establecieron en un área donde el pasto ha crecido durante más de 20 años. La semilla de maleza y el inóculo se espolvorearon sobre la superficie y rastrillados a mano en dos direcciones. Las áreas se rociaron con agua diariamente durante 2 semanas lo suficiente para mantener la humedad de la superficie, pero no suficiente para que el inóculo corra hacia fuera con el agua. El número de plantas de diente de león y cerastio en las áreas de prueba se determinó sobre la estación creciente. La biomasa se midió como el peso fresco en gramos del pasto. Los resultados de este experimento se presentan en la Tabla 18A.

ES 2 347 867 T3

TABLA 18A

Efecto de una aplicación única de 85-24B al suelo sobre la emergencia media de diente de león y cerastio en césped

	Tratamiento de pasto	Tasa de Aplicación g/m ²	Número de malezas por área		Biomasa Fr peso g
			Diente de león	Cerastio	
10	Establecimiento de pasto de semilla	0	100	27	86
		250	46	8	45*
15		500	32	7	71
		1000	16	8	135
	LSD (0.05)		22	7	64
20	Pasto previamente establecido	0	126	20	35
		250	47	nd	55
		500	21	nd	62
25		1000	9	10	63
	LSD (0.05)		14	7	29

* varianza grande debido a los conejos y gansos que se alimentan sobre el pasto en las áreas.

Estos resultados demuestran el control del diente de león y la cerastio en el establecimiento de pastos y en pastos establecidos. Ellos también muestran el uso de 85-24B para mejorar el crecimiento de pasto.

B) Humedad del suelo y temperatura del aire

Estudios adicionales examinan el efecto de la humedad del suelo y temperatura sobre la actividad de control de maleza de varios aislados fúngicos, utilizando cebada sin cáscara como el inóculo (ver anterior). Para estos experimentos se consideraron tres condiciones de humedad del suelo (saturación, capacidad de campo y punto de marchitamiento permanente), junto con días de 20° o 30°C. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 19.

TABLA 19

Efecto de temperatura y humedad del suelo sobre la actividad de control de maleza de varios aislados fúngicos (89-25A, 94-26, 94-359A, y 97-12B) de la presente invención sobre cardo de Canadá

	Régimen de temperatura C	Condiciones de humedad del suelo	Peso de raíz (% de control)	
			Ensayo 1	Ensayo 2
50	30 días/10 noches	Saturación	22 a ^z	31 a
		Capacidad de campo	48 b	38 a
		Punto de marchitamiento permanente	100 c	59 b
55	20 días/10 noches	Saturación	36 a	29 a
		Capacidad de campo	31 a	35 a
60		Punto de marchitamiento permanente	46 a	66 b

^z para cada régimen de temperatura, las letras minúsculas indican diferencias entre condiciones de humedad del suelo promediada sobre cuatro aislados.

Estos resultados ilustran que la mejor actividad de control de maleza se obtiene con la mayor humedad del suelo a cualquier temperatura.

C) Métodos de Aplicación

Los métodos para la aplicación de los aislados fúngicos también se examinaron. Este estudio consideró que la actividad de control de maleza como un resultado de aplicar un inóculo de cebada sin cáscara, o un inóculo líquido. Para la cebada sin cáscara, se examinaron el tamaño de partícula y la respuesta de dosis de la cebada infectada (Tabla 20). Para el inóculo líquido, se examinó el efecto de los homogeneizados de micelio (mezclados con dos composts, lácteos, o compost de cerdo y pollos) sobre la actividad de control de maleza (Tabla 21).

La cebada sometida a autoclave se utilizó para la preparación de un inóculo fúngico como se describió anteriormente. Los granos de cebada estéril inoculada se incubaron durante dos semanas bajo condiciones de laboratorio ambiente, se secaron y se molieron con un molino (es decir, Arthur H. Thomas Co.). El control consiste de granos estériles inoculados tratados de la misma manera. La viabilidad del inóculo molido se determinó al poner en placa 25 piezas sobre la placa de PDA y registrar el número de partículas con crecimiento de colonia después de 3 días y el número de colonias que semejan el aislado fúngico original o son contaminantes después de 7 días.

Para conducir el bio-ensayo, se cortan raíces saludables en segmentos de 10 cm de longitud, estando seguro de que cada segmento de raíz tiene al menos una yema. Los segmentos de raíz lavados se pesan y se colocan dos por olla. El inóculo molido espolvoreado homogéneamente sobre las raíces y la superficie del suelo, por ejemplo aproximadamente 5 g (también se pueden utilizar otras dosis), cubierta con 2-3 cm de mezcla de suelo, y las ollas se colocan en un invernadero. El cambio en el peso de la raíz a las 6 semanas después de la inoculación se registra. Los resultados se presentan en la Tabla 20.

TABLA 20

El efecto del tamaño de gránulo y la dosis de aplicación sobre la eficacia de 85-24B para reducir el peso de la raíz de cardo de Canadá

Tamaño de gránulo ^z (μ)	Dosis de aplicación (g/m ²)	Peso de raíz (% de control)
>840	100	82
	500	55 ^y
	1000	25
840-590	100	98
	500	74
	1000	6
590-49	100	45
	500	46
	1000	2
Error Estándar Agrupado Medio		18

^z > 840 = semilla de cebada completa infestada con 85-24B tuvo 100% de viabilidad/partícula; 840-590 = semilla de cebada infestada molida y pasada a través de una malla 20, pero no un tamiz de malla 30 tuvo 75% de viabilidad/partícula; 590-49 = semilla de cebada infestada molida y pasada a través de un tamiz de malla 30 tuvo 75% de viabilidad/partícula.

^y Media de dos ensayos

Los resultados presentados en la Tabla 20, demuestran que el rango de tamaños de gránulo de cebada y las tasas de aplicación son efectivas para controlar el crecimiento de maleza (indicado mediante crecimiento de raíz reducido). La eficacia creciente se observa con gránulos de tamaño más pequeño y tasas de aplicación de dosis mayores.

Bio-ensayo de Compost

El hongo crece en un cultivo líquido como se describió anteriormente (ver Cultivo de aislados de hongo, Ejemplo 1). Utilizando una capa doble de tela de queso, el líquido se drena mediante fuerza de gravedad desde el micelio. Una proporción de aproximadamente 1:3.2 (v/v) de micelio a agua se homogeniza para producir aproximadamente 10⁵ a 10⁶ cfu/mL. El homogenizado se mezcló con estiércol de compost en una proporción de aproximadamente 1:2 (v/v).

ES 2 347 867 T3

Dos segmentos de raíz de maleza, por ejemplo, aproximadamente 10 cm para raíces de cardo de Canadá, se colocan en una olla que está tres cuartos completa con mezcla de suelo (3 suelo franco arenoso: 1 turba sphagnum: 1 vermiculita grado medio: 1 arena de 9mm lavada tamizada) y firmemente empacada. Los segmentos de raíz se pesan y se colocan dos por olla. El compost tratado (mezcla homogenizado-compost) se coloca en la olla y luego se cubre con una mezcla adicional de suelo antes de enjuagar completamente. Las ollas se colocan en un invernadero, y el número total de brotes/olla, número total de brotes o plantas con síntomas (es decir, clorosis, necrosis, lesiones) se registran a las 2, 4, y 6 semanas. También se recolectan las raíces a las 6 semanas, enjuagadas, y registrado el peso fresco, como es el peso fresco del tejido foliar. Los datos se analizan para varios parámetros:

- i) % de crecimiento de raíz (es decir, [peso de raíz final de tratamiento/peso de raíz inicial del tratamiento] o [peso de raíz final de control/peso de raíz de inicio de control] x 100);
- ii) biomasa foliar.

Los resultados se presentan en la Tabla 21 (A).

TABLA 21(A)

Efecto de utilizar homogenizado micelial de 85-24B para inocular estiércol de compost para el control de cardo de Canadá

Compost	Tratamiento	% de control de peso de raíz	% de control de peso fresco foliar
Lácteo	Sin hongo	100 a	100 a
	Hongo	65 b	76 a
Cerdo y Pollo	Sin hongo	100 a	100 a
	Hongo	28 c	49 c

Estos resultados demuestran que el inóculo líquido preparado como un homogenizado utilizando una variedad de medio de compost, es efectivo para controlar el crecimiento de maleza.

Bio-ensayo de enjuague de suelo

Los aislados fúngicos crecidos en el cultivo líquido como se describió anteriormente (ver Cultivo de aislados fúngicos, Ejemplo 1). Un tratamiento utilizó una mezcla de 94-359A, 94-44B, y 85-24B crecidos durante aproximadamente 4-8 semanas y el otro tratamiento utilizó 85-24B crecido durante 2 semanas. El caldo de micelio y el cultivo líquido se homogenizan para producir aproximadamente 10^3 a 10^4 cfu/mL. El control fue medio de cultivo líquido no inoculado. Veinticinco semillas de diente de león se sembraron con 6mm de profundidad en una mezcla de plantación sin suelo de 100 mL (equivalente a 0.02 m²) y 100 mL de homogenizado se vertió sobre el suelo. Los conteos se hicieron del número de plántulas de diente de león que emergieron y el número de plántulas cloróticas después de 5.7 y 14 días. Los resultados se presentan en la Tabla 21(B).

TABLA 21(B)

El efecto de los homogenizados miceliales de los aislados fúngicos aplicados al suelo empapado para el control de diente de león

Tratamiento	Período de Cultivo	Medio cfu/mL	% de Clorosis		
			5 días	7 días	14 días
Control	2 semanas	0	0	0	0
Mezcla fungosa	4-8 semanas	10^3	100	100	100
85-24B	2 semanas	10^4	0	50	75

Estos resultados demuestran que los homogenizados fúngicos con aproximadamente 10^3 a 10^4 cfu/mL se pueden aplicar como un empapado de suelo a una tasa de aproximadamente 5 L/m² para la actividad de control de maleza, y que se obtuvo una actividad de control de maleza más rápida y mayor con mezclas de inóculo envejecido.

Bio-ensayo de Tratamiento de Semilla

El aislado 94-44B fue crecido en un cultivo líquido durante 4 semanas como se describió anteriormente (Ver Cultivo de aislados fúngicos, Ejemplo 1). El caldo de micelio y el cultivo líquido se homogenizaron para producir aproximadamente 10^3 a 10^4 cfu/mL. El homogenizado fúngico (1 mL) y 1 mL de 2% de metocil (un pegante de celulosa) se utilizó para recubrir 36 semillas de trigo Katewpa (138 cfu/semilla) o 173 semillas de semilla de pasto festuja rojo crepado (29 cfu/semilla) en una placa Petrie de vidrio. La semilla recubierta se secó al aire durante toda la noche en una caperuza de flujo laminar.

Las semillas de trigo y 20 semillas de diente de león se plantaron en una olla de 4 pulgadas con un medio de plantación sin suelo y se llenan de agua completamente. El % de plantas de diente de león con clorosis y la biomasa de trigo de peso fresco se registraron 14 días después. Ver Tabla 21(C).

TABLA 21(C)

El efecto de tratar la semilla de un cultivo con aislado fúngico 94-44B sobre el control de diente de león y sobre el crecimiento de cultivo

Tratamiento	No. de dientes de león clorótico %	Biomasa de cultivo (% de control no tratado)
Semilla de pasto - tratado	6	116
Semilla de pasto – no tratado	0	100
Semilla de trigo - tratado	23*	122*
Semilla de trigo – no tratado	0	100
* significativamente diferente del control no tratado a $P < 0.05$		

Estos resultados demuestran que el aislado fúngico inventivo puede controlar los dientes de león mediante tratamiento de semilla de cultivos. También se demuestra que el efecto de la dosis es tal que las semillas más grandes con más cfu/semilla dieron mayor control que las semillas más pequeñas con menos cfu/semilla.

Aplicaciones de Pulverizado Foliar Pre y Post emergencia

El aislado 94-44B creció en cultivo líquido durante cuatro semanas como se describió anteriormente (Ver Cultivo de aislados de hongo, Ejemplo 1). El cultivo líquido se filtró a través de una prenda de malla de nylon y el caldo de cultivo líquido y las fracciones de micelio se guardaron separadamente. Una alícuota de 150 ml de caldo de cultivo líquido se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa 0.45 μ m para producir el tratamiento de caldo de cultivo filtrado. Otras 150 ml de alícuota de caldo de cultivo líquido tuvieron 15% de micelio (p/v) agregado a éste y luego se homogenizó para producir el tratamiento denominado el caldo de cultivo líquido no filtrado que contiene 10^6 a 10^7 propágulos/mL. (Los propágulos comprendieron tanto fragmentos de micelio como esporas). Estos dos tratamientos más el control de agua se rociaron sobre ollas de 6-4 pulgadas utilizando un rociador de pista a una tasa de 480 L/ha. Cada olla se sembró con 0.11g de pasto cv. La mezcla sobre sembrada y 20 semillas de diente de león en un medio de plantación sin suelo. Las ollas se rociaron 1-2 días después de la siembra como una aplicación de rociado foliar pre-emergente. Las ollas también se rociaron dos semanas después de la siembra como una aplicación de rociado foliar post-emergencia. Tres semanas después del rociado, se registraron los siguientes datos: número total de dientes de león por olla, número de dientes de león cloróticos por olla, peso fresco del pasto por olla en gramos, peso fresco de diente de león por olla en gramos. Ver Tabla 21(D).

ES 2 347 867 T3

Tabla 21(D). El efecto de aplicaciones de rociado pre y post emergencia de caldos de cultivo líquido del aislado 94-44B

Tiempo de Aplicación	Tratamiento de rociado	Peso fresco (como % de control de agua)		Número de dientes de león	
		Pasto	Diente de león	Clorótico (%)	Total
Pre-emergencia	Caldo de cultivo filtrado	123 b	16 c	38 c	5 b
	Caldo de cultivo no filtrado	159 a	31 bc	56 b	7 ab
	Control de agua	100 b	100 a	0 a	10 a
Post-emergencia	Caldo de cultivo filtrado	113 a	20 b	89 b	5 a
	Caldo de cultivo no filtrado	93 a	41 b	86 b	8 a
	Control de agua	100 a	100 a	0 a	7 a
Las diferentes letras minúsculas dentro de una columna para cada tiempo de aplicación indican diferencias significativas a $P < 0.05$.					

Estos resultados demuestran que el aislado fúngico inventivo puede controlar el diente de león mediante métodos de aplicación en pulverizado antes o después de la emergencia de la plante y mejorar el crecimiento de pasto mediante una aplicación de rociado pre-emergente.

Ejemplo 4

Efecto de los Aislados Fúngicos de la Presente Invención sobre Plantas Agrícolamente Importantes

Efecto de los Métodos de Aplicación

A) Inóculo de Bio-ensayo de Esterilla

Un rango de plantas agrícolamente importantes se probaron para determinar la especificidad de huésped de los aislados fúngicos de la presente invención. Los aislados fúngicos se aplicaron a semillas de aceite, cereal, leguminosas, y plantas de forraje utilizando el bio-ensayo de esterilla de inóculo subrayado en el Ejemplo 2. El efecto de estos aislados fúngicos sobre la germinación, clorosis, peso fresco foliar, y mortalidad se examinaron.

Cultivos para Probar Rango de Huésped

La sensibilidad de los cultivos a los aislados fúngicos se probó utilizando el bio-ensayo de esterilla de inóculo (ver Ejemplo 2), utilizando cargas altas de inóculo. Por lo tanto, los resultados muestran más reacciones susceptibles que podrían ocurrir bajo condiciones más naturales de infección.

Los cultivos y cultivares probados fueron como sigue:

1. Cereal y otros monocotiledones

Trigo - cvs. Katepwa, AC Domain, AC Karma, Biggar, Kyle

Cebada - cvs. Harrington, Silky

Avena - cvs. Derby o Walden

ES 2 347 867 T3

Mijo - cvs. Minco o Prairie Gold

Semilla de canario - cvs. NET

5 2. Cultivos de semilla de aceite

Canola - cvs. AC Excel, AC Parkland

10 Mostaza - cvs. Cutlas, Ochre

Lino - cv. Vimy

Girasol - cvs. Cargill SF270 o IS7111

15 Alazor - cvs. Lethbridge

3. Cultivos de legumbres

20 Lenteja - cvs. Laird, Eston

Alverja de campo - cv. Express

Alverja de pollo - cv. Sanford

25 Fríjol Faba - cv. CDC Fatima

4. Cultivos de forraje

30 Tréboles - trébol amarillo cv. Norgold, trébol blanco cvs. Polara y Sonja, trébol común, trébol rojo cvs. Altaswede o Florex

Tres hojas pie de pájaro - cv. Cree

35 Alfalfa - cv. Beaver.

Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 22 (efecto sobre la germinación y clorosis) y la Tabla 23 (efecto sobre el peso fresco foliar y la mortalidad).

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

Tabla 22: Efectos de aislados fúngicos sobre plantas agrícolas importantes. El símbolo más indica un efecto de detrimento a uno o más cultivos probados y las letras indican el número de cultivos afectados (a=1; b=2; c=3; d=4; e=5).

Cultivo	No. de Cultivos	85-24B	94-26	94-44B	94-134	95.54A1	97-12B	89-25A	94-359A	95-268B	97-15B2
Germinación											
Trigo	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cebada	2	-	+a	-	-	-	-	-	-	-	-
Avena	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mijo	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+a
Semilla de	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canario											
Canola	2	-	-	-	-	+a	-	-	-	-	+b
Mostaza	2	+a	-	-	-	+b	+a	+a	+a	-	+b
Lino	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+a
Girasol	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alazor	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lenteja	2	-	-	+a	+a	-	-	-	-	-	-
Arveja de campo	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arveja de pollo	1	-	-	-	-	+a	-	-	-	-	-
Frijol Faba	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tréboles	5	-	-	+a	-	-	+b	+a	+b	+b	-
(continuación)											

ES 2 347 867 T3

	65	60	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5
Tres hojas		1	+a	-	-	-	-	-	+a	+a	+a	-	+a
Pie de													
pájaro													
alfalfa		1	-	-	+a		-	-	-	-	-	-	-
Clorosis													
Trigo		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cebada		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Avena		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mijo		1	-	-	-	-	-	-	-	+a	-	-	+a
Semilla de		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canario													
Canola		2	+b	-	+b	+a	+b	+b	+b	+b	-	+b	-
Mostaza		2	+b	-	+b	-	+b	+b	+b	+b	+a	+b	-
Lino		1	+a	-	-	-	-	-	-	+a	-	-	-
Girasol		1	+a	-	+a	-	+a	+a	-	+a	-	-	-
Alazor		1	+a	-	+a	-	+a	+a	-	-	-	-	+a
Lenteja		2	+b	+b	+b	+b	+b	+b	-	+a	+a	-	+a
Arveja de		1	+a	+a	+a	-	+a	+a	-	-	-	-	+a
campo													
Arveja de		1	+a	-	+a	-	+a	+a	-	-	-	-	+a
pollo													
Frijol Faba		1	+a	+a	+a	-	+a	+a	-	-	-	-	+a

(continuación)

65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15 10 5

Tréboles	5	+d	-	+c	-	+c	+b	+c	+b	+c
Tres hojas	1	+a	-	+a	-	+a	-	+a	+a	+a
Pie de pájaro										
Alfalfa	1	+	+a	+a	-	+a	+a	-	+a	+a

+ indica un efecto de detrimento en al menos uno o más cultivares probados para cada cultivo utilizando ANOVA para comparar el tratamiento y el control en P=0.05;
- indica respuesta sin detrimento al tratamiento utilizando ANOVA para comparar el tratamiento y el control a P=0.05

Tabla 23: El efecto de aislados fúngicos sobre plantas agrícolamente importantes. El símbolo más indica un efecto de detrimento a uno o más cultivares probados y la letra indica el número de cultivares afectados (a=1; b=2; c=3; d=4; e=5).

Cultivo	No. de Cultivares	85-24B	94-26	94-44B	94-134	95.54A1	97-12B	89-25A	94-359A	95-268B	97-15B2
Peso Foliar Fresco											
Trigo	5	+a	na	-	+a	+a	-	-	-	-	-
Cebada	2	-	na	-	-	-	-	-	+a	-	-
Avena	1	+a	na	-	-	-	-	-	-	-	-
Mijo	1	-	na	-	-	+a	-	+a	-	-	+a
Semilla de Canario	1	-	na	-	-	-	-	-	-	-	-
Canola											
	2	+a	na	-	+a	+b	+a	+b	+b	+b	+b
(continuación)											
Mostaza	2	+a	na	-	-	+b	+b	+a	+a	+a	+b

ES 2 347 867 T3

[illegible]

ES 2 347 867 T3

65	Canola	2	+b	+a	+b	+a	+b	+b	5
	Mostaza	2	+b	-	+b	-	+b	+b	10
	Lino	1	+a	-	-	-	-	+a	15
	Girasol	1	+a	-	na	na	na	na	20
	Alazor	1	+a	-	+a	-	-	+a	25
	Lenteja	2	+b	+a	+b	-	-	-	30
	Arveja de campo	1	+a	-	+a	-	-	-	35
	Arveja de pollo	1	-	-	+a	-	-	-	40
	Frijol Faba	1	-	-	+a	-	-	-	45
	Tréboles	5	+e	-	+a	+a	+a	+d	50
	Tres hojas	1	+a	-	+a	-	+a	+a	55
	Pie de pájaro								60
	Alfalfa	1	+a	+a	+a	-	+a	+a	65

+ indica un efecto de detrimento en al menos uno o más cultivos probados para cada cultivo utilizando ANOVA para comparar el tratamiento y el control en P=0.05;

- indica respuesta sin detrimento al tratamiento utilizando ANOVA para comparar el tratamiento y el control a P=0.05

Los resultados presentados en las Tablas 22 y 23 demuestran que muchos cultivares de plantas de especias agrícolas importantes no se afectan por los aislados de hongos de la presente invención cuando se aplican a cargas de inóculo altas, y que estos aislados se pueden utilizar como bioherbicidas para controlar la actividad de malezas en la presencia de cultivos. Las cargas de inóculo más bajas, que son efectivas para exhibir actividad de control de malezas pero no dañinas para las plantas de cultivo, se pueden utilizar para minimizar el impacto sobre las plantas agrícolas si se desea.

B) Inóculo de Cebada Sin Cáscara

Para determinar los efectos residuales de una aplicación simple de aislados fúngicos de la presente invención sobre cultivos agrícola importantes crecidos en el campo, se aplicaron aislados fúngicos de muestra al suelo utilizando un inóculo de cebada sin cáscara a 1 kg/m² en tres diferentes períodos dentro de la estación de crecimiento para controlar el cardo de Canadá (Ver Ejemplo 3, Duración de Aplicación). La semilla de lenteja del cultivar Laird se cosechó en las áreas tratadas y de control a una tasa de 70-80 kg/ha aproximadamente 10-14 meses después del tiempo de aplicación del bioherbicida. El número de plantas de lenteja emergidas por área y el número de plantas con clorosis se contó. Los resultados de este experimento se presentan en la Tabla 24(A). Los datos de un experimento similar, sobre cardo de Canadá, se presentan en la Tabla 18.

TABLA 24(A)

El efecto del inóculo fúngico residual de 85-24B aplicado al suelo sobre la emergencia media de lenteja por área y número medio de plantas de lenteja con clorosis por área

Tratamiento	Emergencia	Clorosis
Control	38 ± 12S.E.	0
Aplicado:		
Junio 1999	46 ± 1	1.5
Agosto 1999	40 ± 13	0
Octubre 1999	19 ± 30.3	

Estos resultados demuestran que los aislados fúngicos en la presente invención no tienen una actividad residual dañina para los cultivos de campo agrícola importantes cuando se aplican a tasas altas de aplicación de campo en la primavera y el verano bajo condiciones naturales de infección.

Ejemplo 5

Producción de fitotoxina

La actividad de control de maleza de los aislados fúngicos muertos con calor se examinó. El inóculo de cebada sin cáscara fue muerto con calor y se aplicó a cardo de Canadá o el inóculo muerto con calor se mezcló con semilla de pasto contaminada con 5% de semilla de diente de león como se describe adelante (Tablas 24(B) y 24(C)). Los resultados indican que los aislados fúngicos muertos con calor retuvieron la actividad de control de maleza. Por lo tanto, el efecto del caldo inoculado filtrado o los extractos de aislados fúngicos de la presente invención sobre el crecimiento de maleza también se examinó (Tabla 25).

Control de Maleza del Agente Fúngico o mediante Metabolitos Producidos por el Agente Fúngico

El inóculo de granos de cebada sin cáscara se preparó como se subrayó anteriormente (Ejemplo 3). El inóculo de cebada se sometió a autoclave y se aplicó al suelo en el cual estaba creciendo cardo de Canadá o el inóculo se mezcló semilla de pasto contaminada con 5% de semilla de diente de león (ver Ejemplo 3 anterior). Como un control, se aplicó grano de cebada regular o inóculo de cebada no infestado al suelo. Estos resultados se repitieron bajo invernadero y condiciones de campo. Los resultados de los experimentos se muestran en la Tabla 24B y en la Tabla 24C.

ES 2 347 867 T3

TABLA 24(B)

El efecto de los granos de cebada infestada con hongo muerto con calor sobre cardo de Canadá

5	Tratamiento	Clorosis	% de control de peso de raíz	% Mortalidad
	Aislado fúngico 89-25A			
10	Control no tratado	No	100 a	0
	Grano infestado	Si	9 b	70 c
15	Grano sometido a autoclave	a Si	33 b	20 ab
	Aislado fúngico 97-12B			
	Control no tratado	No	100 a	0
20	Grano infestado	Si	67 ab	30 b
	Grano sometido a autoclave	a Si	55 ab	17 ab
25	Las diferentes letras dentro de una columna indican diferencias significativas en $P < 0.05$ utilizando la prueba de rango múltiple de Duncan. La viabilidad de hongos de grano infestado fue de 100% mientras que la viabilidad en la muestra sometida a autoclave fue de 0%.			

30 Estos experimentos demuestran que el inóculo de hongo muerto con calor exhibe una actividad de control de maleza, y que el inóculo de hongo vivo no se requiere para la actividad de control de maleza.

Estos resultados sugieren que se hace un producto natural mediante aislados de hongo de la presente invención. Los extractos crudos de una fracción de fitotoxina se obtuvieron y analizaron para activar el control de maleza.

TABLA 24(C)

El efecto de los granos de cebada infestados con hongo muerto con calor (aislado 85-24B) sobre la emergencia de diente de león en césped

40	Tratamiento	No. Promedio de diente de león por área	Biomasa de Pasto por área (peso fresco g.)
45	Sin grano	117	50
	Grano	48	57
	Grano infestado	19	69
50	Grano infestado muerto con calor	16	98
	LSD (0.05)	16	29
55	Prueba de campo conducida en la mitad de agosto y que corrió durante 4 semanas antes de tomar la biomasa.		

60 Estos resultados demuestran que el agente fúngico o los metabolitos producidos por el agente fúngico pueden controlar el diente de león en céspedes y que los metabolitos pueden mejorar el crecimiento del pasto.

Extracción de Fitotoxina y Bio-ensayo

65 Los aislados fúngicos crecieron en medio de cultivo líquido sobre un agitador durante 4 semanas bajo luz y condiciones de temperatura ambiente. El cultivo se separó en un caldo y una fracción de micelio mediante filtración de vacío utilizando un embudo Buchner recubierto. Un papel de filtro Whatman #1 y 2-4 capas de tela de queso. La fracción de caldo (caldo inoculado filtrado) se redujo hasta sequedad o utilizando un roto-evaporador (40°C) o un secador por congelamiento. La fracción de micelio se colocó en cloroformo durante 3 horas durante toda la noche luego se sometió

a vacío filtrado a través de papel de filtro Whatman #1 para separar el disolvente y el micelio. El disolvente filtrado fue roto-evaporado hasta sequedad. El control fue un medio de cultivo líquido inoculado tratado lo mismo que la fracción de caldo. Los extractos secos se almacenados en recipientes en el refrigerador hasta uso. Para la prueba, los extractos secos tanto del caldo como las fracciones de micelio se disolvieron primero en 2-5 ml de agua destilada y luego una cantidad igual de 80% de metanol se agregó a cada recipiente. El tratamiento de control fue de 40% de metanol. El metanol y los extractos de etil acetato también se obtuvieron de una fracción de micelio luego de la etapa de extracción de cloroformo, y se examinaron para la actividad de control de maleza como se describe adelante.

Se utilizó un bio-ensayo para determinar la presencia de fitotoxinas en gotas de las fracciones que originaron síntomas cloróticos similares a aquel causado por los hongos sobre las hojas de una planta susceptible (en este ejemplo, se utilizó frijol Faba como una planta de prueba) o cardo de Canadá (huésped maleza). Las semillas de frijol Faba se plantaron sobre una mezcla de suelo y disminuidas a 5 plantas por olla utilizando 2 ollas por tratamiento. Las raíces de cardo de Canadá se plantaron en mezcla de suelo y después de 3 semanas, las ollas con 2-3 retoños se seleccionaron. Dos - 10 ul gotas de un extracto se aplicaron a 2 hojas por planta de frijol Faba y 3 hojas por retoño de cardo de Canadá; una gota sobre una herida de punción hecha de una picadura de insecto y la otra gota directamente sobre la superficie de la hoja. Las plantas se observaron diariamente durante 10 días para clorosis.

Un bio-ensayo diferente se utilizó para determinar el impacto de las fitotoxinas de las fracciones sobre el peso fresco del frijol Faba. En este ensayo, las semillas de frijol Faba se mezclaron con 1 ml de extracto y 1 ml de 2% de metocil para recubrir las semillas y luego dejarlas secar al aire durante toda la noche. Cinco semillas se plantaron por olla en mezcla de suelo. Las plantas se calificaron para emergencia y clorosis después de 10 días, y la biomasa foliar (peso fresco) después de 4 semanas.

La actividad de control de maleza de estos extractos de disolvente se presentan en la Tabla 25 (A; extracto de cloroformo) y la Tabla 25 (B; cloroformo, metanol y extractos de etil acetato).

La actividad de control de manejos, determinada entre el porcentaje de plantas cloróticas (fríjol faba, FB o cardo del Canadá, CT) observada 10 días después de recibir as gotas de un extracto de cloroformo obtenida de un aislado so de 94-26, se presenta en la Tabla 25 (A).

TABLA 25(A)

Activado y control de maleza de un extracto de disolvente de un estado fúngico de la presente invención. El control de disolvente es de 40% de metanol, o el cardo inoculado

Tratamiento	% plantas cloróticas					
	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3	Ensayo 4
	FB	CT	FB	CT	FB	FB
Control de disolvente	0	0	0	0	0	0
Cardo no inoculado	0	0	0	0	0	0
Cardo inoculado	100	67	90	80	100	100
filtrado						
Micelio-cloroformo	100	100	0	0	0	100

Tratamiento n = 10 plantas

La actividad de control de malezas de cloroformo, metanol o fracciones de etil acetato también se examinaron. La actividad de control de maleza se ensaya al monitorear la emergencia, clorosis, y peso fresco foliar de frijol faba que se había tratado con varios extractos de disolvente de 94-26, o cardo de control no inoculado. Los resultados de este experimento están presentes en la Tabla 25(B).

TABLA 25(B)

Activado el control de maleza de varios extractos de disolvente de un aislado fúngico de la presente invención. El cardo no inoculado es un control

Tratamiento	Emergencia %	Clorosis %	Peso fresco g
Cardo no inoculado	93 a	0	36 a
Cardo inoculado filtrado	100 a	100 b	18 cd
Micelio –cloroformo	100 a	100 b	11 d
Micelio –metanol	87 a	87 b	20 bc
Micelio –etil acetato	93 a	13 a	37 a

n = 15 plantas; diferentes letras dentro de una columna indican diferencias significativas en $P < 0.05$ utilizando una prueba LSD.

Los resultados presentados en las Tablas 25(A) y (B) demuestran que el cardo inoculado filtrado y los extractos de disolventes obtenidos de los aislados fúngicos de la presente invención indujeron síntomas de enfermedad, redujeron el crecimiento, y exhibieron actividad de control de maleza en plantas susceptibles. Por lo tanto, el caldo inoculado filtrado, los extractos de micelio, o una combinación de estos, se puede utilizar para el control de malezas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para controlar una o más malezas de hoja ancha que comprende administrar micelios de *Phoma cf macrostoma* aislados de Canadá, un extracto obtenido de micelios de *Phoma cf macrostoma*, o una combinación de los mismos, al suelo donde crecen dichas semillas, en donde dicho extracto se selecciona del grupo que consiste de inóculo de cebada muerta con calor, un extracto de cloroformo de dicho aislado de *Phoma cf macrostoma*, un extracto de etanol de dicho aislado de *Phoma cf macrostoma*, y extracto de etil acetato de dicho aislado de *Phoma cf macrostoma*.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho uno o más malezas de hoja ancha en unas especies de una familia seleccionada del grupo que consiste de Compositae, Caryophyllaceae, Convolvulaceae, Plantaginaceae, y Rubiaceae.

3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho uno o más malezas de hoja ancha se seleccionan del grupo que consiste de cardo de Canadá, cardo de siembra perenne, diente de león, *Zanilla inodora*, amor de hortelano, cerastio, trigo sarraceno, correhuela, plátano, girasol de la pradera, trébol y mostaza.

4. Un agente de biocontrol que comprende micelios de uno o más un aislado de *Phoma cf macrostoma*, aislado de cardo de Canadá, un extracto obtenido de micelios de *Phoma cf macrostoma*, o una combinación de los mismos, en donde dicho extracto se selecciona del grupo que consiste de inóculo de cebada muerta con calor, un extracto de cloroformo de dicho aislado de *Phoma cf macrostoma*, un extracto de metanol de dicho aislado de *Phoma cf macrostoma*, y un extracto de etil acetato de dicho aislado de *Phoma cf macrostoma*.

5. El agente de biocontrol de la reivindicación 4, en donde dicho uno o más aislado de *Phoma cf macrostoma*, se selecciona del grupo que consiste de:

- a) 85-24B (IDAC 230201-1, depositado Febrero 23, 2001)
- b) 89-25A (IDAC 110401-1, depositado Abril 11, 2001)
- c) 94-26 (IDAC 230201-2, depositado Febrero 23, 2001)
- d) 94-44B (IDAC 230201-3, depositado Febrero 23, 2001)
- e) 94-134 (IDAC 230201-4, depositado Febrero 23, 2001)
- f) 94-359A (IDAC 110401-2, depositado Abril 11, 2001)
- g) 95-54A1 (IDAC 230201-5 depositado Febrero 23, 2001)
- h) 95-268B (IDAC 110401-3 depositado Abril 11, 2001)
- i) 97-12B (IDAC 230201-6 depositado Febrero 23, 2001)
- j) 97-15B2 (IDAC 110401-4, depositado Abril 11, 2001) y una combinación de los mismos.

6. Una composición de biocontrol, que comprende un agente de biocontrol de la reivindicación 4 o reivindicación 5, y un medio para soportar la viabilidad de dicho uno o más un aislado de *Phoma cf macrostoma*.

7. La composición de biocontrol de la reivindicación 6, en donde dicho medio se selecciona del grupo que consiste de Agar, pesto, granulado de turba, vermiculita, arcilla, almidones, cardo de dextrosa de papa, cardo de jugo V8®, grano de cereal y grano de legumbre.

8. Una semilla de cultivo recubierta, que comprende

- (i) micelios de uno o más aislados de *Phoma cf macrostoma*, aislado de cardo de Canadá o un extracto obtenido de micelios de *Phoma cf macrostoma*, y
- (ii) un ligador,

donde dicho extracto se selecciona del grupo que consiste de inóculo de cebada muerta con calor, un extracto de cloroformo de dicho aislado de *Phoma cf macrostoma*, un extracto de metanol de dicho aislado de *Phoma cf macrostoma*, y un extracto de etil acetato del aislado de *Phoma cf macrostoma*.

ES 2 347 867 T3

9. La semilla de cultivo recubierta de la reivindicación 8, en donde dicho aislado de *Phoma cf macrostoma*, se selecciona del grupo que consiste de:

- a) 85-24B (IDAC 230201-1, depositado Febrero 23, 2001)
- b) 89-25A (IDAC 110401-1, depositado Abril 11, 2001)
- c) 94-26 (IDAC 230201-2, depositado Febrero 23, 2001)
- d) 94-44B (IDAC 230201-3, depositado Febrero 23, 2001)
- e) 94-134 (IDAC 230201-4, depositado Febrero 23, 2001)
- f) 94-359A (IDAC 110401-2, depositado Abril 11, 2001)
- g) 95-54A1 (IDAC 230201-5 depositado Febrero 23, 2001)
- h) 95-268B (IDAC 110401-3 depositado Abril 11, 2001)
- i) 97-12B (IDAC 230201-6 depositado Febrero 23, 2001)
- j) 97-15B2 (IDAC 110401-4, depositado Abril 11, 2001) y una combinación de los mismos.

10. Un método para controlar el desarrollo de maleza durante el crecimiento de cultivos que comprende:

- a) agregar una cantidad efectiva del agente de biocontrol de la reivindicación 4 o reivindicación 5 o de la composición de biocontrol de la reivindicación 6 o reivindicación 7 para producir un suelo tratado;
- b) plantar dichos cultivos en dicho suelo tratado;
- c) hacer crecer dicho cultivo.

11. Un método para controlar el desarrollo de malezas durante el crecimiento de cultivos que comprende:

- a) Plantar dicho cultivo;
- b) agregar una cantidad efectiva de dicho agente de biocontrol de la reivindicación 4, reivindicación 5 de la composición de biocontrol de la reivindicación 6 o reivindicación 7 al suelo donde dicho cultivo se plantó;
- c) hacer crecer dicho cultivo.

12. Un método para controlar el desarrollo de malezas durante el crecimiento de cultivos que comprende:

- a) agregar una cantidad efectiva de dicho agente de biocontrol de la reivindicación 4, o reivindicación 5 de la composición de biocontrol de la reivindicación 6 o reivindicación 7 a las semillas de cultivo, para producir semillas de cultivo tratadas;
- b) plantar dicha semilla de cultivo tratada;
- c) desarrollar dicho cultivo.

13. Un método para controlar el desarrollo de malezas durante un crecimiento de cultivo establecido de cultivo que comprende:

- a) agregar una cantidad efectiva de dicho agente de biocontrol de la reivindicación 4 o reivindicación 5 o la composición de biocontrol de la reivindicación 6 o reivindicación 7 al cultivo establecido; y
- b) desarrollar e cultivo.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde dicho cultivo es un cultivo perenne.

ES 2 347 867 T3

15. El método de la reivindicación 14, en donde dicho cultivo perenne se selecciona del grupo que consiste de un césped, un pasto perenne, y un cereal de invierno.

5 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde el cultivo es un pasto y la semilla de cultivo es semilla de pasto.

10 17. Un método para controlar el desarrollo de malezas que comprende aplicar el agente de biocontrol de la reivindicación 4 o reivindicación 5 o la composición de biocontrol de la reivindicación 6 o reivindicación 7 al suelo en donde dicha maleza crece.

18. El método de la reivindicación 17, en donde dicho agente de biocontrol es un extracto de dicho uno o más un aislado de *Phoma macrostoma*.

15 19. El método de la reivindicación 17, en donde dicho agente de biocontrol es dicho uno o más de un aislado de *Phoma macrostoma*.

20. El método de la reivindicación 17, 18 o 19, en donde dicha etapa de aplicar comprende empolverar, restregar, regar, perforar, poner banda, difundir, rociar, inyección de líquido, verter o empapar el suelo.

25 21. El método de la reivindicación 17, 18, 19 o 20, en donde dicho agente de biocontrol se aplica a suelo antes de la emergencia.

22. El método de la reivindicación 17, 18, 19, 20 o 21, en donde dicho agente de biocontrol se aplica al suelo después de la emergencia de la maleza.

23. Un método para controlar el desarrollo de maleza que comprende aplicar el agente de biocontrol de la reivindicación 4 o reivindicación 5 o la composición de la reivindicación 6 o reivindicación 7 a dicha maleza.

30 24. El método de la reivindicación 23, en donde dicha etapa de aplicar comprende espolvorear, restregar, esparcir, difundir, rociar, o verter.

35

40

45

50

55

60

65

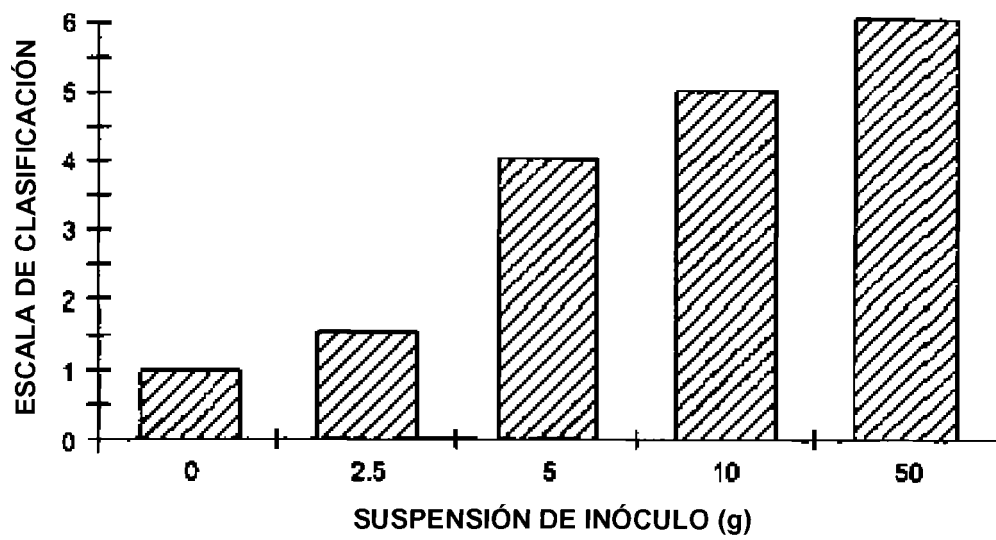


FIG. 1

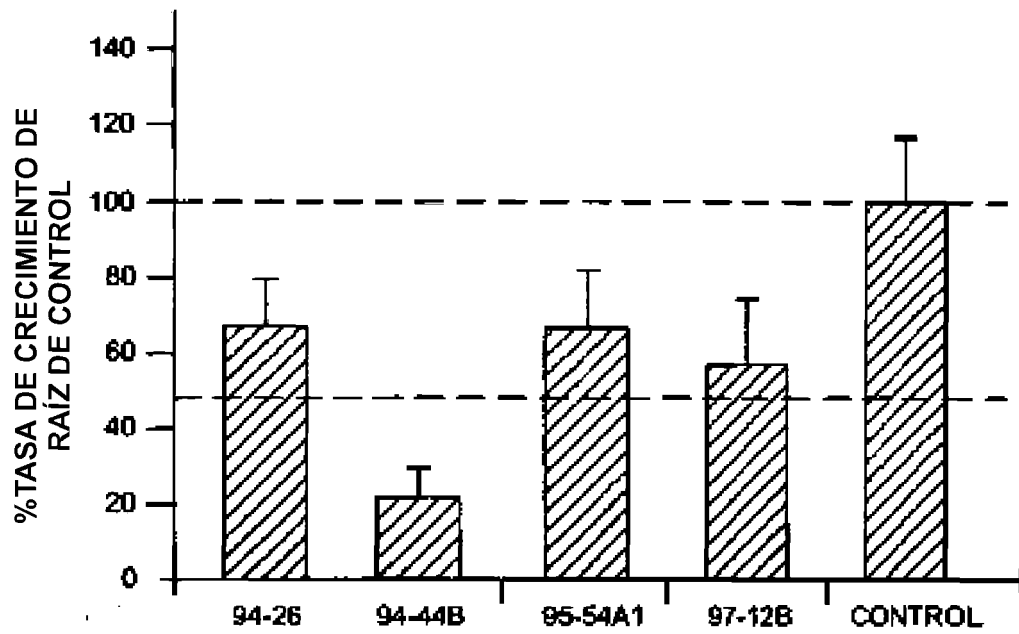


FIG. 2

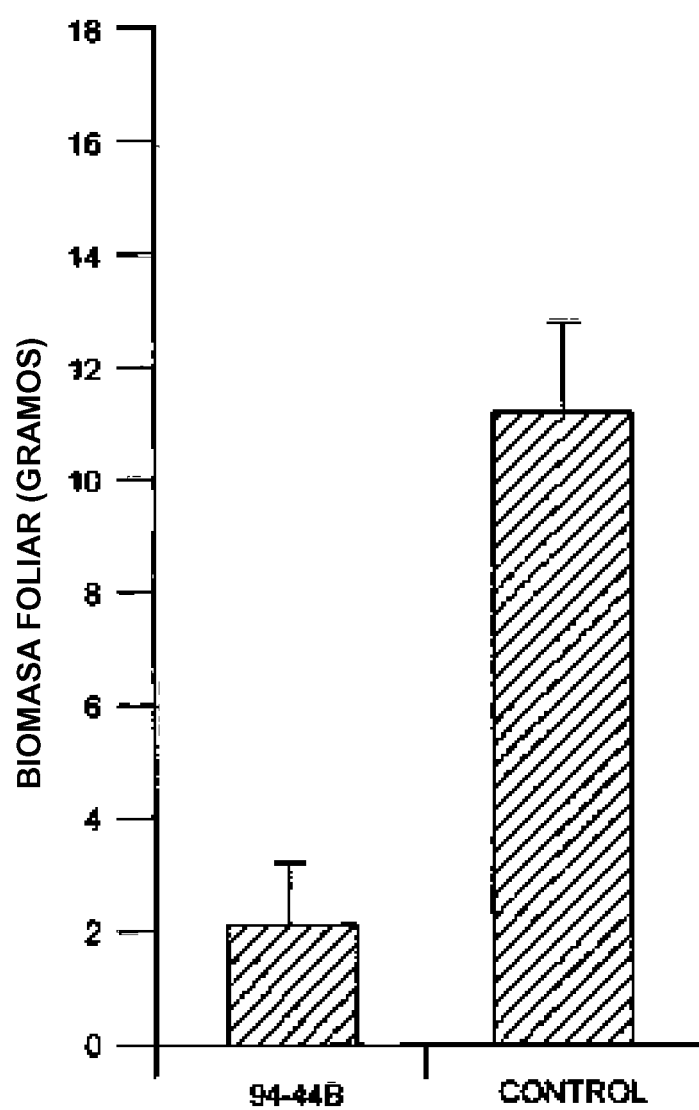


FIG. 3

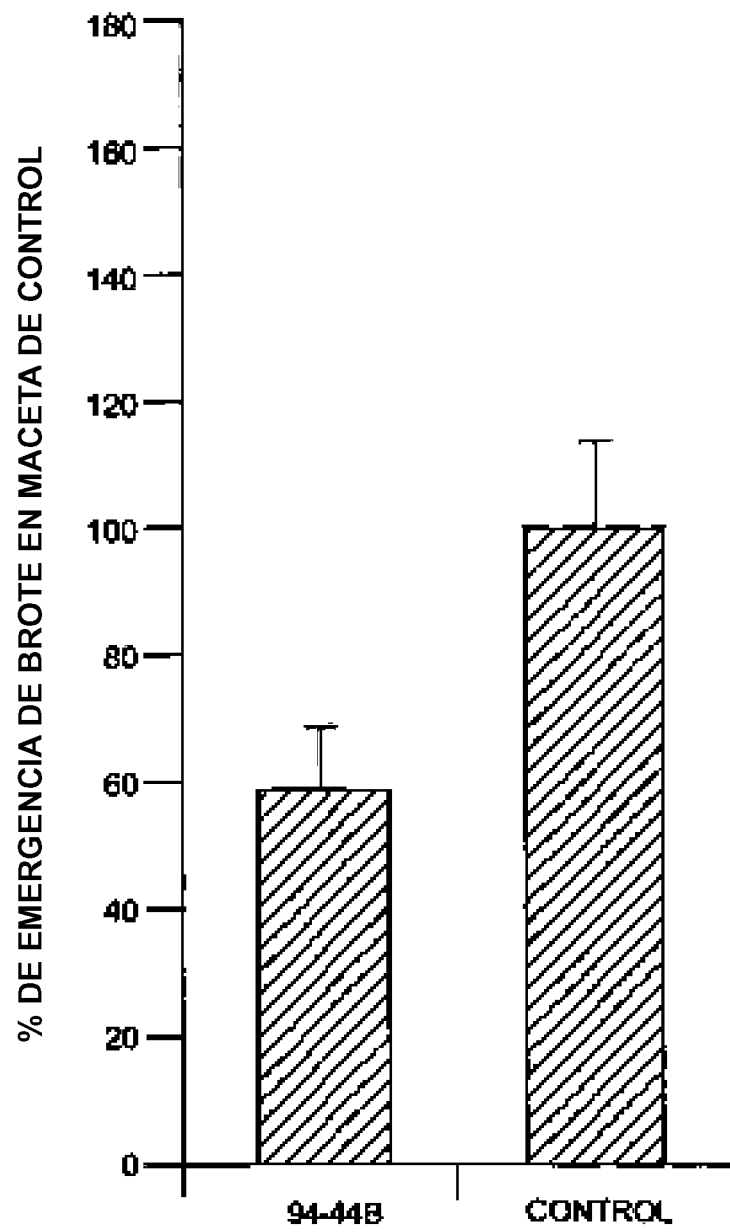


FIG. 4

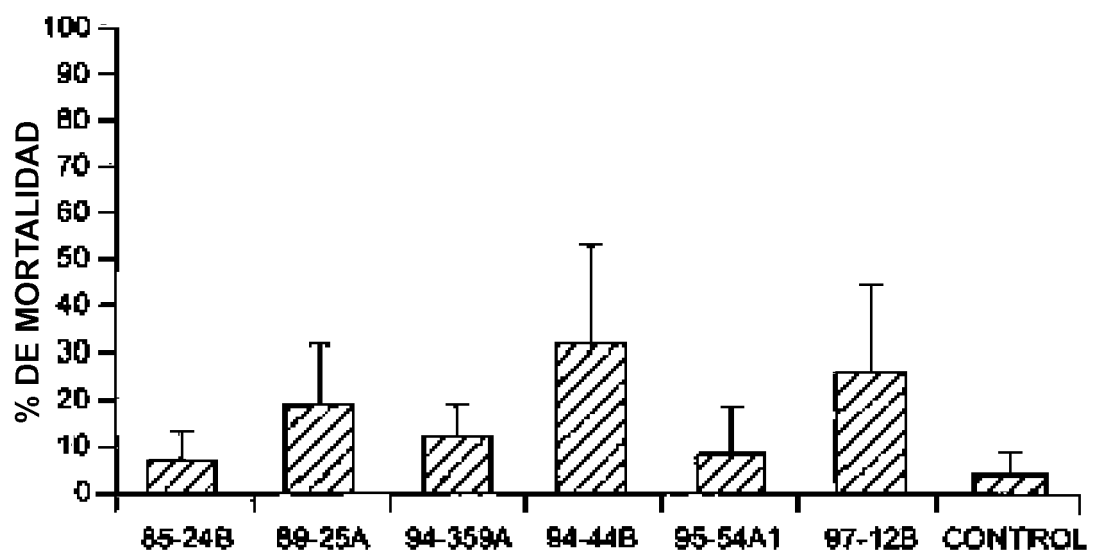


FIG. 5