

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 600**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

C12R 1/885 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2008** **E 08008754 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014** **EP 1990404**

54 Título: **Cepa de Trichoderma atroviride, método de aislamiento de dicha cepa, método de obtención de un producto basado en dicha cepa y uso de dicha cepa**

30 Prioridad:

09.05.2007 FR 0703293

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

03.06.2014

73 Titular/es:

AGROLOR CENTRE D'AFFAIRES "LE CAHN"
(100.0%)
17 RUE LAURENT BONNEVAY
54100 NANCY, FR

72 Inventor/es:

DHUICQ, LAURENT

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 464 600 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Trichoderma atroviride*, método de aislamiento de dicha cepa, método de obtención de un producto basado en dicha cepa y uso de dicha cepa

La presente invención está relacionada con la utilización de la especie *Trichoderma atroviride* contra las enfermedades de las plantas, y más particularmente una nueva cepa de *Trichoderma atroviride*, denominada AGR2, y su utilización como producto fitosanitario destinado a la protección de los cultivos contra las enfermedades criptogámicas, específicamente para la vid.

La nueva cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 fue aislada de un suelo francés cultivado y presentada ante la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur con el número I-2738, el 19 de octubre de 2001.

Los hongos del género *Trichoderma* se usan generalmente como productos de base para innumerables preparaciones fitosanitarias, destinadas al tratamiento de enfermedades criptogámicas.

De esta forma, la patente FR 2 841 436 describe una composición de microorganismos utilizada para combatir determinadas enfermedades criptogámicas que afectan la vid, como son los casos de la esca o la eutipiosis. Esta composición está constituida por una mezcla de una bacteria, una levadura y un hongo, específicamente una cepa de *Trichoderma*.

La patente FR 2 8694 832 describe una cepa particular de *Trichoderma harzanium* que constituye la base de un producto fitosanitario destinado a la lucha biológica de enfermedades criptogámicas de la madera de la vid, como la esca o el eutipiosis.

El documento Elmer P A G ET AL. : « Biosuppression of Botrytis cinerea in grapes » PLANT PATHOLOGY (OXFORD), vol. 55, no. 2, abril 2006, páginas 155-177, describe la utilización de *Trichoderma atroviride* LC52 en la lucha contra las enfermedades de las plantas, en particular contra *Botrytis cinerea*.

El documento JP 11 225745 describe la utilización de *Trichoderma atroviride* SKT-1, SKT-2 y SKT-3 en la lucha contra las enfermedades de las plantas.

El documento EP1 279 335 describe la utilización de la especie *Trichoderma atroviride* en la lucha contra las enfermedades de las plantas, como el producto fitosanitario por pulverización, como el producto fitosanitario constituido por este microorganismo solamente y como el producto destinado a la simulación en las raíces, la germinación y el crecimiento de las plantas.

El documento Schubert Mark « in vitro und ad planta Studien zum Einsatz von Trichoderma-Arten für die Biologische Kontrolle Holz abbauender Pilze an Bäumen" 2006, Freiburg im Breisgau Extrait de l'Internet: URL: <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/dissts/Freiburg/Schubert2007.pdf> divulga un estudio sobre el empleo de diversas cepas de *Trichoderma* para control biológico de hongos linofagos en los árboles.

La presente invención propone la especie *Trichoderma atroviride* así como una nueva cepa de *Trichoderma atroviride* y su utilización, sola o en un producto fitosanitario, para la protección de los cultivos contra las enfermedades criptogámicas, específicamente para la vid contra las enfermedades de la madera:

- la Esca, debido a un complejo fúngico, compuesto de dos categorías de hongos, los hongos pioneros (*Eutypa lata*, *Phaemoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*) y los hongos secundarios (*Fomitiporia punctata*, *Stereum hirsutum*),
- Brazo Negro Muerto, causado por *Botryosphaeria dothidea*, *B. stevensii*, *Botryosphaeria spp*,
- Eutipiosis causado por un solo hongo, *Eutypa lata*, que penetra en la madera a partir de las heridas ocasionadas por cortes, causando un debilitamiento de la madera,
- y Excoriosis debido a *Phomopsis viticola*.

Según la invención la especie *Trichoderma atroviride* en general así como la nueva cepa AGR2 en particular permiten igualmente luchar contra las enfermedades criptogámicas para todos los cultivos, específicamente:

- el Moho gris debido a *Botrytis cinerea*, *B. alli*,
- la Esclerotinia debido a *S. sclerotiorum*, *S. minor*, *S. cepivorum*,
- la Fusariosa debido a *Microdochium nivale*, *F. oxysporum*,
- la Armillaria debido a *Armillaria mella*.

Para este fin, la presente invención tiene como objeto la utilización de la especie *Trichoderma atroviride* en la lucha contra las enfermedades de las plantas.

La misma se relaciona igualmente con una cepa de *Trichoderma atroviride* caracterizada porque se trata de la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 presentada ante en la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur con el número I-2738.

5 La cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 según la invención fue identificada por medio de diversos métodos. La observación microscópica de la morfología, de la medición de los elementos conidiógenos y de las conidias globulosas no ornamentales, así como un olor característico arrojó como conclusión un hongo de la especie *Trichoderma atroviride*.

10 La identificación de la cepa fue más depurada por un análisis molecular basado en la secuencia de la región ITS1-ITS2 des ARNr (ácido ribonucleico ribosomal) 18S y 25S. Una comparación de las homologías de dichas regiones con la secuencia de la cepa de referencia de la especie permite identificar la cepa como un hongo de la especie *Trichoderma atroviride*.

15 Las técnicas moleculares, en particular la secuenciación del gen *EF1α*, permiten identificar sin ambigüedad la especie como un *Trichoderma atroviride* seguido de una comparación de la secuencia del gen con el de la especie de referencia. Por otra parte, la prueba de detección denominada « test 11 » resulta positiva, confirmando así la pertenencia de la cepa a la especie *Trichoderma atroviride*.

20 Como conclusión, dicha cepa de hongo se ubica así en la taxonomía de los microorganismos : *Eucaryota*, *Fungi*, *Ascomycota*, *Pezizomycotina*, *Sordariomycetes*, *Hypocreomycetidae*, *Hypocreales*, *Hypocreaceae*, *Hypocrea*, *Trichoderma atroviride*.

25 El aislamiento del género *Trichoderma* puede realizarse a partir de una muestra de tierra o a partir de materias orgánicas. El suelo será de preferencia húmedo, cultivado o de jardín de manera que posea una concentración importante de *Trichoderma*.

30 Después de tose marlas, las muestras se secan a temperatura fresca (20-25°C), trituran y homogeneizan y después se conservan en sacos de plástico en un lugar fresco (4-5°C) en espera de proceder al aislamiento. Aunque pueden ser mantenidas por varios meses, es preferible, sin embargo, tratarlas lo más rápidamente posible.

El aislamiento de la población de *Trichoderma*, en particular la *Trichoderma atroviride* AGR2, tomada de muestra se realizará en medios específicos seleccionados:

35 - el medio de Davet compuesto por:

o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$:	1g,
o $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$:	1 g,
o KNO_3 :	250 mg,
o $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$:	250 mg,
o KH_2PO_4 :	125 mg,
o sacarosa :	2g,
o ácido cítrico :	50 mg,
o gel de agar:	25 g,
o agua destilada :	1000 ml.

Después de pasarlo por la autoclave, el pH es ajustado a 4,5 con HCl 1 N antes de añadir al medio tibio sulfato de estreptomycinina (30 mg), vinclozolina (2,5 mg), y alcohol alílico (0,5 ml).

40 - el medio TSM de Elad y otros que comprende:

o $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$:	200 mg,
o KH_2PO_4 :	900 mg,
o KCl :	150 mg,
o NH_4NO_3 :	1 g,
o glucosa:	3g,
o cloranfenicol:	250 mg,
o fenaminosulfo :	300 mg,
o quintozeno :	200 mg,
o rosa bengala :	150 mg,
o gel de agar :	20 g,
o agua destilada:	1000 ml.

- el medio TME de Papavizas compuesto por:

o glucosa :	1g,
o gel de agar:	20 g,
o agua destilada :	800 ml.

La mezcla se coloca después en el autoclave. Se le añaden 200 ml de V-8, el pH debe estar comprendido entre 3,8 y 4. En el medio aún tibio, se añade sulfato de neomicina (100 mg), bacitracina (100 mg), penicilina G (100 mg), cloroneb (100 mg), nistatina (20 mg), clortetraciclina HCl (25 mg), y propionato de sodio (500 mg).

Cuando se realiza el aislamiento a partir de una muestra de tierra, se emplea la técnica de la incorporación directa del suelo. El medio de aislamiento es vertido y mantenido en sobrefusión en placas de Petri a 37-40°C, una pequeña cantidad de tierra (5 a 15 mg) es espolvoreada e inmediatamente dispersa en el medio, mientras se agita suavemente hasta la solidificación. Los cultivos se colocan posteriormente en incubación durante algunos días. Tras la detección de las colonias que no entran en confluencia, se procede al examen, a la enumeración y después al aislamiento de las colonias.

Un pesaje de la muestra de tierra antes y después de la siembra permite conocer precisamente la masa de tierra analizada y así calcular el número de propágulos presentes por gramo de tierra.

Para el aislamiento a partir de materias orgánicas, se emplea la técnica de las suspensiones-diluciones.

Este principio consiste en poner la muestra de suelo en suspensión en el agua estéril, y luego en incorporar las diferentes diluciones de dicha suspensión en el medio de aislamiento.

Con este fin, se adicionan 10 gramos de tierra a 90 ml de agua estéril con una gota de Tween. El conjunto se agita por espacio de 30 minutos para constituir la solución –madre (dilución a 10^{-1}). Las muestras sucesivas de 10 ml de dicha suspensión madre y luego las siguientes, a las que se adicionan 90 ml de agua estéril constituyen las diluciones siguientes (10^{-2} , 10^{-3} ... hasta 10^{-6} en general).

En el momento del análisis, se vierten 10 ml de cada solución en un erlenmeyer que contiene 90 ml de medio selectivo de aislamiento, mantenido en sobrefusión en baño de María a 37-40°C. Después de la homogeneización, los 100 ml se reparten en las placas de Petri y se colocan en condiciones propicias en aislamiento de *Trichoderma*.

Después de 3 a 5 días de incubación, se observa la dilución que presenta un número de colonias suficientes pero sin confluencia, lo que traería como resultado complicar el aislamiento. Una vez escogida la dilución de trabajo, se puede proceder al examen, a la enumeración y al aislamiento de las colonias.

Tras replantarse en el medio PDA, y exponer a la luz por 4 o 5 días, se procede a la purificación, es decir, al aislamiento monospórico de cada una de las colonias. Para cada colonia, se toman las esporas de color verde, se suspenden en agua estéril a fin de disociarlas antes de ponerlas a cultivar para cada espora.

Se selecciona cada colonia que parezca la más vigorosa en cada placa de Petri y luego se trasplanta en una nueva placa de Petri y se recolecta.

A fin de seleccionar la cepa susceptible de poseer el mejor potencial antagonista, se escoge realizar una prueba de confrontación una con respecto a la otra de una cepa de *Botrytis cinerea*, que es un patógeno polífago de numerosos cultivos.

El clon de *Trichoderma atroviride* AGR2 se selecciona como el de mayor eficacia con respecto al Moho gris. Estos resultados pueden resumirse igualmente en la aplicación de la especie *Trichoderma atroviride*.

Las placas de Petri se incuban a 20°C durante algunos días hasta 2738, que se mantiene como la aparición de una esporulación. Estas esporas se recogen con la ayuda de una pequeña pinza, y luego se conservan en micoteca.

Se realizó un estudio sobre la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2, que fue trasplantada cada 4 días hasta la vigésima generación. El método de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) no permitió evidenciar ninguna mutación de la cepa.

En conclusión, la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 presenta una estabilidad genética, permitiendo su utilización en los viñedos y otros cultivos.

Se realizaron varios estudios a fin de evaluar la eficacia del hongo contra diferentes agentes patógenos.

El poder antagónico de *Trichoderma atroviride*, y en particular de la cepa AGR2, se midió con respecto a los hongos asociados a las enfermedades de la madera de la vid: *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitiporia punctata*, *Eutypa lata*, *Botryosphaeria obtusa*, *Botryosphaeria parva*, *Botryosphaeria stevensii*.

Estos diferentes hongos, aislados de cepas perjudiciales de esca, eutipiosis, de marchitez de la Syrah, de BDA o de plantas injerto, se conservan a 4°C en tubo en medio de malta-agar (15 g de malta y 20 g de gel de agar para un litro de agua. El medio es esterilizado a 120°C durante 20 mn). Se trasplantan de los tubos de conservación en medio malta-agar a las placas de Petri para la multiplicación y las pruebas de confrontación con *Trichoderma atroviride* AGR2. Por otro lado, una cepa de referencia de *Trichoderma harzianum* se incluyó en esta prueba.

Durante la realización de la confrontación, se extraen dos implantes de micelios de 6 mm de diámetro de los hongos a estudiar de una colonia en crecimiento activo en medio de malta y se colocan en la placa de Petri de manera

diametralmente opuesta. La distancia entre los dos implantes es de 45 mm.

Producto del crecimiento lento de algunos hongos, la siembra de estos se anticipó 8 días (caso de *E. lata*, *F. punctata*, *P. aleophilum*) o 15 días (caso de *P. chlamydospora*) con relación al *Trichoderma* en confrontación. Las cajas se incubaron a 25°C. Por cada par, se efectúan tres repeticiones. El testigo corresponde al crecimiento del hongo solo (sin la presencia del *Trichoderma*).

Durante la primera semana, las placas se observan y se toma nota sobre ellas todos los días. Estas operaciones se realizan posteriormente todas las semanas. Los apuntes consisten en evaluar la inhibición del crecimiento de la colonia micelial.

La tasa de inhibición, expresada en mm, corresponde a la diferencia entre el radio R1 de la colonia de la placa testigo y el radio R2 que está situado a la derecha vinculando el centro de los dos protagonistas en confrontación ($I = R1 - R2$). La tasa de inhibición se calcula al término de 4 días para *B. parva*, 5 días para los *B. obtusa* y *B. stevensii*, 7 días para *E. lata* y *F. punctata*, 9 días para *P. chlamydospora* y 12 días para *P. aleophilum*.

La lectura de los resultados se hace igualmente por observación de los micelios en confrontación: presencia de una zona de inhibición, recubrimiento de un micelio por otro, competencia espacial, zonas de melanización, fructificaciones...

Al término de las confrontaciones, cada implante se coloca nuevamente en un medio de cultivo de malta (15 g de malta y 20 g de gel de agar para un litro de agua. El medio se esteriliza a 120°C durante 20 min). Entonces se observa la iniciación o no de la colonia.

Los resultados se representan en la tabla II

Tabla II – Tasa de inhibición (expresada en mm) del crecimiento micelial de los diferentes hongos implicados en las enfermedades de la madera de la viña frente a la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 (medida al cabo de los 4 a 12 días de confrontación)

MICROORGANISMOS Patógenos	Radio de la colonia testigo	Tasa de inhibición (mm)	
		<i>T. atroviride</i> AGR2	<i>T. harzianum</i> (ref.)
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> LR47	14	3	1,7
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> LR81	16	5	3
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i> LR3	17,5	7,7	1,7
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i> LR23	15,2	3,5	-6,8
<i>Fomitiporia punctata</i> LR14	22,7	8,3	3,7
<i>Fomitiporia punctata</i> LR30	26,7	10	5
<i>Eutypa lata</i> cc260	36	7,7	1,5
<i>Eutypa lata</i> MT247	38,7	10,7	9,4
<i>Botryosphaeria obtusa</i> F98-1	48,2	25,2	22,6
<i>Botryosphaeria obtusa</i> F99-8	43,9	23,9	19,9
<i>Botryosphaeria parva</i> Bd021	48,6	21,9	18,3
<i>Botryosphaeria stevensii</i> Bs001	54,1	29,4	25,7

El antagonismo de *Trichoderma atroviride* AGR2, y en general el de la especie *Trichoderma atroviride*, es entonces real con respecto a los hongos patógenos *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitiporia punctata*, *Eutypa lata*, *Botryosphaeria obtusa*, *Botryosphaeria parva*, *Botryosphaeria stevensii*. La cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 inhibe el crecimiento de las cepas y recubre con frecuencia las colonias produciendo fructificaciones en sus superficies.

El recultivo de los implantes de *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitiporia punctata*, *Eutypa lata*, *Botryosphaeria obtusa*, *Botryosphaeria parva*, *Botryosphaeria stevensii* muestra que éstos vuelven a desarrollarse raramente.

Otras pruebas permitieron igualmente mostrar el rol antagónico de la cepa según la invención hacia otros hongos patógenos de la viña como *Stereum hirsutum*, *Phomopsis viticola*, *Phellinus ignarius*, *Phellinus viticola*, *Armillaria mella*.

Por otra parte, las tasas de inhibición de la cepa de referencia de *Trichoderma harzianum* son inferiores a la de la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2, mostrando así un antagonismo superior que el del género *Trichoderma harzianum*.

La observación del comportamiento de la referencia *Trichoderma harzianum* muestra que la misma no recubre la colonia de *Phaeomoniella chlamydospora* ni la de *Phaeoacremonium aleophilum*. Los dos protagonistas se quedan solamente

en contacto. El recultivo del implante de la colonia probada muestra que los aislantes patógenos no se desarrollan.

Por el contrario, ésta recubre la colonia de *Fomitiporia* y produce fructificaciones en su superficie. El recultivo del implante de la colonia probada muestra que las cepas patógenas Fp 14 y Fp 30 no se desarrollan.

La tasa de inhibición de *Trichoderma harzianum* en el encuentro de la cepa de *Eutypa lata* cc260 es muy baja: la cepa no recubre la colonia patógena, que posteriormente se desarrolla en la colonia de *Trichoderma*. Por el contrario la tasa de inhibición contra la cepa de *Eutypa lata* MT247 puede ser considerada como similar a la de *Trichoderma atroviride*.

La cepa de *Trichoderma harzianum* no coloniza el cultivo de los *Botryosphaeria*. Posteriormente, *B. obtusa*, *B. parva* y *B. stevensii* recubren *Trichoderma harzianum*. La nueva puesta del implante de la colonia probada en el medio de cultivo muestra que *B. obtusa*, *B. parva* y *B. stevensii* se desarrollan.

Así entonces, si *Trichoderma harzianum* ejerce una determinada tasa de inhibición, ésta es frecuentemente muy baja con respecto a los diferentes hongos de la madera y no parece ser un buen antagonista para la lucha contra las enfermedades de la madera, contrariamente al *Trichoderma atroviride*.

Por último, el poder antagónico de la especie *Trichoderma atroviride*, y en particular el de la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 fue igualmente evaluado con respecto a los hongos patógenos de los otros cultivos: *Sclerotinia sclerotium*, *Sclerotinia minor*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis*, *Microdochium nivale*, *Fusarium culmorum*.

Estos diferentes hongos, aislados a partir de cultivos logrados de esclerotinia (Colza, lechugas), Moho gris (viña), fusariosa (cereales), Fomopsis (tornasol), se conservan a 4°C en un tubo en medio de malta-agar (15 g de malta y 20 g de gel de agar para un litro de agua. El medio se esteriliza a 120°C durante 20 min). Estos se trasplan tan de los tubos de conservación en medio malta-agar a las placas de Petri para la multiplicación y las pruebas de confrontación con *Trichoderma atroviride*.

Durante la confrontación, se recogen dos implantes miceliales de 6 mm de diámetro de los hongos a estudiar de una colonia en crecimiento activo en medio de malta y se colocan en la placa de Petri de manera diametralmente opuesta. La distancia entre los dos implantes es de 50 mm. Las cajas se incuban a 25°C. Para cada pareja, se efectúan tres repeticiones. El testigo corresponde al crecimiento del hongo solo (sin la presencia del *Trichoderma*).

Durante 6 días, las cajas son observadas y se toman apuntes. Los apuntes consisten en evaluar la inhibición del crecimiento de la colonia micelial. La tasa de inhibición, expresada en mm, corresponde a la diferencia entre el radio R1 de la colonia de la placa testigo y el radio R2 que está situado a la derecha vinculando el centro de los dos protagonistas en confrontación ($I = R1 - R2$). La tasa de inhibición se calcula al cabo de 6 días.

La lectura de los resultados se hace igualmente por observación de los micelios en confrontación: presencia de una zona de inhibición, recubrimiento de un micelio por otro, competencia espacial, zonas de melanización, fructificaciones...

Los resultados son representados en la tabla III

Tabla III – Tasa de inhibición (expresada en mm) del crecimiento micelial de los diferentes hongos patógenos de los cultivos frente a la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 (medida a los 4 a 6 días de confrontación)

MICROORGANISMOS PATÓGENOS	Radio de la colonia testigo	Tasa de inhibición (mm)	
		T. atroviride AGR2	T. harzianum (ref.)
<i>Sclerotinia sclerotium</i>	83	15.0	11.9
<i>Sclerotinia minor</i>	85	36.7	22.1
<i>Botrytis cinerea</i>	77,3	29.6	27.8
<i>Phomopsis hélianthi</i>	56,5	12.8	6.7
<i>Microdochium nivale</i>	32	5.0	3.2
<i>Fusarium culmorum</i>	45,5	9.3	10.2

El antagonismo de *Trichoderma* es entonces real con respecto a los hongos patógenos *Sclerotinia sclerotium*, *Sclerotinia minor*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis viticola*, *Microdochium nivale*, *Fusarium culmorum*. La cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 inhibe el crecimiento de los aislados y recubre muy frecuentemente las colonias produciendo fructificaciones en sus superficies. El recultivo de los implantes de *Sclerotinia sclerotium*, *Sclerotinia minor*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis viticola*, *Microdochium nivale*, *Fusarium culmorum* muestra que éstos no se vuelven a desarrollar.

Por último, cuando la especie *Trichoderma atroviride*, y en particular la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2, se incorporan en una tierra previamente esterilizada, es decir, en ausencia de patógenos, se observa una acción de estimulación de la germinación y el crecimiento de las lechugas.

El ensayo se realizó en cápsulas de 672 cm², rellenas con tierra esterilizada y sembradas con *Trichoderma atroviride* AGR2 en 3 dosis (33,6, 67,2 y 672 mg de producto técnico por cápsula) antes de sembrar la lechuga (variedad laitue-lactosa Titan) a razón de 20 lechugas por cápsula. Se garantiza un rociado regular diariamente durante 35 días.

Los resultados son representados en la tabla IV

Tabla IV – Estimulación de la germinación y el crecimiento de la lechuga por incorporación de la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 en una tierra esterilizada (índice 100 para el testigo).

Criterio de observación	Testigo	Dosis A (33,2 mg)	Dosis B (67,2 mg)	Dosis C (672 mg)
Germinación a J+7	100	146,2	138,5	115,4
Número de hojas a J+33	100	115,1	125,8	112,1
Longitud de las hojas a J+33	100	137,1	146,7	123,8

El efecto de estimulación actúa desde la primera dosis (33,2 mg/cápsula). La concentración 20 veces superior (672 mg) muestra una buena selectividad ya que la estimulación está siempre presente; sin embargo, ésta es menos importante que para las dosis A y B.

Se realizaron ensayos de resistencia y sensibilidad de la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 frente a agentes antimicrobianos, utilizados como fungicidas de los cultivos. Además de su carácter práctico para una utilización del clon I-2738 por los agricultores, los resultados pueden igualmente permitir un mejor conocimiento de *Trichoderma atroviride* AGR2.

Las pruebas de crecimiento in vitro del *Trichoderma atroviride* AGR2 se realizan en gel de agar enriquecido con productos comerciales que contienen sustancias fungicidas estudiadas.

La metodología empleada es la siguiente:

- constitución de una solución de 100 ml para cada producto a probar en el cual se diluye el producto comercial
- adición de 0,126 ml de la solución en medio de cultivo Sabouraud (peptona micológica a 10 g.L⁻¹, glucosa a 40 g.L⁻¹, agar a 15 g.L⁻¹)
- depósito de un implante micelial de *Trichoderma atroviride* AGR2 de 3 mm y cultivado a temperatura ambiente.
- Medición del crecimiento del testigo

Los resultados son representados en la tabla V

Tabla V – Inhibición del crecimiento micelial la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 por diferentes productos fitosanitarios (crecimiento expresado en porcentaje del testigo)

Producto comercial (marcas colocadas)	Materia (s) activa(s)	Concentración de la solución (/100ml)	J+1	J+2	J+3
Cursor®	Cimoxanil+Folpel +Mancozeb +Cobre	1,25 g	105,46	103,38	106,85
Microthiol®	Azufre	6,25 g	90,00	85,63	100,00
Round up®	Glifosato	6 ml	95,95	94,16	100,00
Stroby DF®	Kresoxi-metil	0,1 g	74,58	81,88	100,00
Témoin®	-	-	100,00	100,00	100,00
Acrobat®	Dimetomorfo +Mancozeb	1,25 g	62,65	68,54	88,63
Légend®	Quinoxifén	0,1 ml	106,68	90,15	88,05
Scala®	Pirimetanil	1,25 ml	95,14	90,51	87,25
Valiant®	Fosetil-Al+Folpel +Cimoxanil	1,5 g	66,22	76,61	86,76
Hoggar®	Espiroxamina	0,3 ml	52,00	61,02	81,57
Odéna®	Folpel +Iprovanicarbo	1 g	66,16	65,17	81,17
Tairel F®	Benalaxil+Folpel	1,25 ml	58,66	60,41	76,86
Surfassol®	Diclobenil	50 g	38,07	50,67	76,08
Dobran®	Kresoxi-metil	0,1 g	77,18	73,02	74,93
Olymp®	Fluzilazol	0,15 ml	59,13	62,54	72,73
Basta®	Glufosinato-amonio	1,25 ml	77,18	64,72	64,25
Panthéos®	Dimetomorfo +Folpel	1 g	79,96	61,05	58,38
Karathane®	Dinocap	0,3 ml	89,19	64,51	55,13
Score®	Difenoconazol	0,06 ml	66,52	48,07	48,45
Sumisclex®	Procimidón	0,15 ml	49,65	29,35	24,42
Sekoya®	Fluazinam	0,75 ml	33,99	20,15	17,93

Sting [®]	Glifosato	5,4 ml	43,06	15,49	12,19
Jonk [®]	Dietofencarbo +Carbendazima	1 ml	0,00	0,00	0,00
Geoxe [®]	Fludioxonilo	0,5 g	0,00	0,00	0,00

Con el objeto de obtener un producto técnico que sirva de base a la producción de un producto fitosanitario destinado a proteger los cultivos, se desarrolló una técnica de producción. La misma se divide en dos etapas: la primera guarda relación con la realización del inóculo primario, que tuvo lugar en el laboratorio. La segunda fase consiste en la realización adecuada del producto técnico.

En un primer momento, la producción del inóculo primario de *Trichoderma atroviride* AGR2 en el laboratorio se realiza en placas de Petri, en un medio de cultivo Sabouraud (peptona micológica a 10 g.L⁻¹, glucosa a 40 g.L⁻¹, agar a 15 g.L⁻¹) o un medio malta-agar. Se añade a este medio cloranfenicol a una concentración de 2 mL.L⁻¹ de una solución a 5 g/50 mL de etanol, el cloranfenicol impide el desarrollo de bacterias indeseables. La cepa utilizada para la producción del inóculo primario es la cepa madre depositada en el Instituto Pasteur.

Tras el cultivo y la observación visual de los hongos presentes en la placa de Petri, las placas de Petri eventualmente contaminadas por microorganismos que no son de la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 se eliminan.

La segunda fase consiste en preparar el producto técnico propiamente dicho. Para ello, las esporas de *Trichoderma atroviride* AGR2, contenidas en las placas de Petri se inoculan en un sustrato orgánico como las pulpas de remolacha, papa, hojuelas de avena, cebada o maíz, malta-agar o PDA estériles. A fin de favorecer la esporación de la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2, se añade cloruro de calcio a razón de 4 g.kg⁻¹ de soporte orgánico.

La realización de dicha fase se lleva a cabo de la manera siguiente: el contenido en esporas de las placas de Petri se mezcla en un sistema de elaboración con agua y CaCl₂. La mezcla se reparte en plataformas para incubación en un recinto climatizado a 20-25°C, donde se mantiene una higrometría y una aeración necesarias para el crecimiento del *Trichoderma atroviride*.

A los 4 a 6 días de incubación, el conjunto se seca y microniza en forma de polvo para constituir el producto técnico, rico en esporas de *Trichoderma atroviride* AGR2. Un recuento de células de Malassez determina su concentración en esporas: según los soportes orgánicos utilizados, éste va de 10⁸ a 10¹⁰ esporas por gramo.

Un procedimiento ventajoso reivindicado por la presente invención consiste en utilizar un sustrato orgánico extruido, lo que permite un crecimiento rápido de *Trichoderma* y de las concentraciones elevadas en esporas por gramo. Este polvo constituye la base de productos fitosanitarios múltiples adaptados a los diferentes usos deseados.

Se llevaron a cabo diferentes estudios a fin de verificar la inocuidad de la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 en el hombre y su medioambiente, ya sea durante la fabricación del producto técnico o durante su aplicación en los cultivos.

Así, cuatro estudios realizados en lombrices de tierra, peces, delfines y algas demostraron la perfecta seguridad de la cepa para el medioambiente.

No se reportó ningún efecto de la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 en las micorrizas, los hongos nematófagos, ni los nemátodos.

El crecimiento micelial de la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 es óptimo a una temperatura comprendida entre 20 y 25°C. Por el contrario, su crecimiento es nulo a 37 °C, lo que hace suponer que no puede desarrollarse *in vivo* en el hombre.

No obstante, se realizaron las pruebas complementarias siguientes a fin de evaluar los efectos que puede tener el producto técnico en los mamíferos y por extrapolación el hombre. Estas pruebas se relacionan con:

- la sensibilización cutánea,
- la sensibilización por inhalación,
- la toxicidad aguda por vía oral,
- la toxicidad aguda por la vía intraperitoneal,
- la toxicidad aguda por vía dérmica,
- la irritación aguda en los ojos,
- la aberración cromosómica de los linfocitos humanos,
- la toxicidad, patogenicidad e infecciosidad agudas por vía intratraqueal.

Cada una de estas pruebas reveló que la cepa según la invención es perfectamente segura y que no produce ningún metabolito sensible que pueda representar un riesgo perceptible para la salud humana o para el medioambiente.

Como consecuencia, *Trichoderma atroviride* AGR2 y el producto técnico no presentan ningún efecto tóxico, patógeno e infeccioso en caso de exposición.

Un uso ventajoso de la presente invención, es decir, la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2, es su utilización en la formulación de un producto fitosanitario como materia activa. Así, el polvo obtenido por el modo de producción descrito con anterioridad puede ser mezclado o no en uno o varios componentes tales como: una o varias de otras materias activas, uno o varios sustratos nutritivos y/u orgánicos y/o minerales, uno o varios humectantes, uno o varios dispersantes, uno o varios anti-espumas, etc... para obtener un producto final con las características y en la

concentración en esporas deseadas.

El producto de tratamiento fitosanitario a base de la cepa natural de *Trichoderma atroviride* AGR2 está destinado al tratamiento de las enfermedades fúngicas que afectan la vid como la eutipiosis, la esca, el brazo negro muerto, la excoriosis la armilaria y el Moho gris, en la medida en donde la cepa actúa sobre estos hongos patógenos que atacan la vid.

Así, según un primer uso, el producto fitosanitario será aplicado por pulverización o recubrimiento en las cepas de vid, después de la poda o en cualquier otro periodo del año para efectuar una protección contra las enfermedades de la madera.

Así, se llevó a cabo un estudio en el viñedo, confirmando los resultados precedentes realizados en vitro.

En invierno, el día de la poda, el producto fitosanitario a base de *Trichoderma atroviride* AGR2 o de *Trichoderma atroviride* se pulverizada en las zonas afectadas a concentraciones variables de 5%, 2,5% y 1%. Se toman dos porciones de ramas, primero 7 días después de la pulverización, luego a los 45 días. A partir de la cara, la madera se cortada en 8 láminas de 1 milímetro de espesor. Dichas láminas se colocan en placas de Petri que contienen un medio de gel de agar a fin de ser artificialmente contaminadas con las esporas de los dos hongos pioneros patógenos: *Eutypa lata* y *Phaeomoniella chlamydospora*.

Cuando el producto fitosanitario se aplica a una dilución a 2,5%, presenta una buena capacidad de control del desarrollo del hongo patógeno *Eutypa lata*. El producto fitosanitario se mantiene eficaz en un periodo de 45 días mínimo después de la poda.

Para el control de *Phaeomoniella chlamydospora*, una dilución a 2,5% del producto fitosanitario es suficiente que se mantiene eficaz inclusive 45 días después de la poda.

Este estudio demuestra igualmente que la eficacia de la pulverización del producto fitosanitario a base de *Trichoderma atroviride* AGR2 es superior al de una solución al 1% de un producto químico que contiene 125 g/l de Flusilazol + 250 g/l de Carbendazima, cuyo derivado se emplea habitualmente para el tratamiento de la esca.

La especie *Trichoderma atroviride* y la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2, en forma de un producto fitosanitario, actúan bien sobre los hongos patógenos *Phaeomoniella chlamydospora* y *Eutypa lata*.

En otros ensayos, la pulverización de una composición a base de *Trichoderma atroviride* AGR2 en las heridas por cortes muestra que este coloniza la madera hasta una profundidad de 15 milímetros, y se mantiene presente por un periodo de 6 a 10 meses.

Según un segundo uso, el producto según la invención podrá ser aplicado en el suelo y/o ser utilizado para embarrar (cubrir) las raíces de las plantas jóvenes antes de plantarlas a fin de estimular el crecimiento de sus raíces y luchar contra la Armillaria.

Según un tercer uso, el producto según la invención puede ser pulverizado en los racimos de uvas para luchar contra el Moho gris, agente responsable de la pudrición de las uvas. En efecto, en este caso, la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 debe luchar contra los efectos nocivos de los rayos UV. Sin embargo, la misma posee un gen *phr1* inducido por la luz azul, que se expresa a la vez en el micelio vegetativo puesto que carece de los pigmentos fotoprotectores, y en los conidióforos. Este gen codifica para fotólisis, catalizando la reparación del ADN.

Por otra parte, la luz visible induce el desarrollo de esporas pigmentadas y resistentes. Es así posible considerar una utilización de la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 durante un tratamiento aéreo de los cultivos, sin arriesgar un fenómeno de foto degradación excesiva por los rayos UV.

La cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 coloniza igualmente el suelo, en particular cuando se comienza el cultivo, y sobre todo cuando se realiza un aporte en materia orgánica. Es en efecto un hongo conocido por presentar una buena aptitud en el desarrollo saprofítico en el suelo.

Según un cuarto uso, los productos según la invención podrán ser entonces aplicados en el suelo y/o ser utilizados para embarrar (cubrir) las raíces de las plantas jóvenes antes de sembrarlas a fin de luchar contra las enfermedades de infección de las raíces, específicamente para las producciones de hortalizas, tales como Esclerotinia, Rhizoctonia, Botrytis, Fonte de siembras relacionadas con el fusarium, Pitio, etc...

Como se ha observado, durante los ensayos en terrina, un crecimiento más rápido de las plantas de lechugas, esto podrá ser ventajosamente utilizado para estimular el crecimiento de las plantas y raíces, y luchar contra el síndrome de la fatiga de los suelos, específicamente en los plantones de fresas.

Se comprueba que la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 no presenta ningún riesgo para el medioambiente, en la misma medida en que la cepa no presenta ninguna toxicidad, ni poder infeccioso sobre ninguno de los organismos vivos con los cuales el producto fitosanitario pudiera entrar en contacto durante su utilización, y específicamente ninguna incidencia en el hombre.

El producto fitosanitario puede ser empleado entonces como medio alternativo de protección de los cultivos, en el contexto de tratamientos biológicos, sólo o como complemento de los tratamientos químicos privilegiando en estos

últimos los más respetuosos de la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2.

5 El hecho de utilizar el producto técnico o fitosanitario en forma de un polvo humectable aplicado por pulverización facilita el tratamiento de las vides, en la medida que es más rápido de utilizar que el lavado químico empleado habitualmente para el tratamiento de las heridas por cortes y que representa una operación minuciosa, extensa y molesta.

Aunque la invención se describe con medios de realización particulares, la misma comprende todos los equivalentes técnicos de los medios descritos.

10

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Trichoderma atroviride* **caracterizada porque** se trata de la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 depositada ante la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur con el número I-2738.
2. Método para aislar la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 según la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende las etapas siguientes:
 - a. recoger la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 en una muestra de tierra,
 - b. espolvorear y dispersar la muestra recogida en la etapa anterior en una placa de Petri a 37-40°C conteniendo un medio de aislamiento,
 - c. agitar suavemente hasta la solidificación del medio,
 - d. incubar por varios días,
 - e. examinar, enumerar y aislar las colonias de *Trichoderma atroviride* AGR2.
3. Método para aislar la cepa de *Trichoderma atroviride* AGR2 según la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende las etapas siguientes:
 - a. recoger una muestra de tierra compuesta de materias orgánicas,
 - b. suspender dicha muestra (10g) en 90 ml de agua estéril con una gota de Tween,
 - c. agitar durante 30 minutos,
 - d. tomar de 10 ml de dicha solución y luego sucesivas diluciones hasta 10^{-6} ,
 - e. adicionar 10 ml de cada solución en 90 ml de medio de aislamiento, mantenido en sobrefusión en baño de María a 37-40°C,
 - f. homogeneizar y repartir en placas de Petri,
 - g. incubar durante 3 a 5 días,
 - h. examinar, enumerar y aislar las colonias de *Trichoderma atroviride* AGR2.
4. Método de aislamiento según una de las reivindicaciones 2 ó 3, **caracterizado porque** comprende las etapas siguientes:
 - a. trasplantar las colonias aisladas en medio PDA, y exponer a la luz durante 4 a 5 días,
 - b. recoger las esporas de color verde,
 - c. suspender las esporas en el agua estéril,
 - d. seleccionar la colonia más vigorosa,
 - e. trasplantar a una placa de Petri,
 - f. prueba de confrontación con una cepa de *Botrytis cinerea*.
5. Método de aislamiento según una de las reivindicaciones 2 ó 3, **caracterizado porque** el medio de aislamiento es el medio de Davet, constituido por:

- Ca(NO ₃) ₂ :	1g,
-CaCl ₂ , 2H ₂ O:	1g,
- KNO ₃ :	250 mg,
- MgSO ₄ , 7H ₂ O:	250 mg,
- KH ₂ PO ₄ :	125 mg,
- sacarosa:	2g,
- ácido cítrico:	50 mg,
- gel de agar:	25 g,
- agua destilada:	1000 ml;

el medio se coloca posteriormente en el autoclave, con ajuste del pH a 4,5 con HCl 1 N; y luego añadir al medio tibio de sulfato de estreptomicina (30 mg), vinclozolina (2,5 mg), y alcohol alílico (0,5 ml).
6. Método de aislamiento según una de las reivindicaciones 2 ó 3, **caracterizada porque** el medio de aislamiento es el medio TSM de Elad y otros que comprende:

- Mg SO ₄ , 7H ₂ O:	200 mg,
- KH ₂ PO ₄ :	900 mg,
- KCl :	150 mg,
- NH ₄ NO ₃ :	1g,
- glucosa:	3g,
- cloranfenicol:	250 mg,
- fenaminosulf :	300 mg,
- quintozeno :	200 mg,

- rosa bengala : 150 mg,
- gel de agar: 20 g,
- agua destilada 1000 ml

el medio se coloca después en el autoclave, y se le añaden 200 ml de V-8, el pH debe estar comprendido entre 3,8 y 4 ; cuando está aún tibio, al medio se le añade sulfato de neomicina (100 mg), bacitracina (100 mg), penicilina G (100 mg), cloroneb (100 mg), nistatina (20 mg), clorotetraciclina HCL (25 mg), propionato de sodio (500 mg).

7. Método de aislamiento según una de las reivindicaciones 2 ó 3, **caracterizado porque** el medio de aislamiento es el medio de aislamiento TME de Papavizas constituido por :

- glucosa : 1 g,
- gel de agar: 20 g,
- agua destilada: 800 ml,

que se coloca posteriormente en el autoclave, luego se le añaden 200 ml de V-8, el pH debe estar comprendido entre 3,8 y 4 ; cuando está aún tibio, se le adiciona sulfato de neomicina (100 mg), bacitracina (100 mg), penicilina G (100 mg), cloroneb (100 mg), nistatina (20 mg), clorotetraciclina HCL (25 mg), y propionato de sodio (500 mg).

8. Método de obtención de un producto a base de Trichoderma atroviride AGR2 obtenido según el método de una de las reivindicaciones 2 a 7, **caracterizado porque** consiste en diferentes etapas :

- a. producir la cepa de Trichoderma atroviride AGR2 realizada en placas de Petri conteniendo un medio de cultivo Sabouraud o malta-agar, que contiene cloranfenicol,
- b. aislar las cepas de Trichoderma atroviride AGR2, presentándose en forma de esporas,
- c. inocular la cepa del hongo en pulpas de remolacha, papa, hojuelas de avena, de cebada o de maíz, de malta-agar o PDA estériles,
- d. extruir el conjunto del sustrato, lo que permite obtener una concentración elevada de esporas,
- e. adicionar cloruro de calcio.
- f. incubar en cámara no estéril durante 4 a 6 días,
- g. secar y micronizar en forma de polvo.

9. Utilización de la cepa de Trichoderma atroviride AGR2 según la reivindicación 1 u obtenida según el método de una de las reivindicaciones 2 a 8 en la lucha contra las enfermedades de las plantas.

10. Utilización de la cepa de Trichoderma atroviride AGR2 según la reivindicación 1 u obtenida según el método de una de las reivindicaciones 2 a 8, como producto fitosanitario por pulverización, o recubrimiento, o por embarre de las raíces.

11. Utilización de la cepa de Trichoderma atroviride AGR2 según la reivindicación 1 u obtenida según el método de una de las reivindicaciones 2 a 8, como el producto fitosanitario constituido por este sólo microorganismo.

12. Utilización de la cepa de Trichoderma atroviride AGR2 según la reivindicación 1 u obtenida según el método de una de las reivindicaciones 2 a 8, como producto fitosanitario en asociación con otros fungicidas químicos.

13. Utilización de la cepa de Trichoderma atroviride AGR2 según la reivindicación 1 u obtenida según el método de una de las reivindicaciones 2 a 8, como medio de lucha contra la esca, la eutipiosis, el brazo negro muerto, la excoriosis y la esclerotinia.

14. Utilización de la cepa de Trichoderma atroviride AGR2 según la reivindicación 1 u obtenida según el método de una de las reivindicaciones 2 a 8, como producto fitosanitario que actúa contra los hongos patógenos como Eutypa lata, Phaeomoniella chlamydospora, Phaeomoniella aleophilum, Fomitiporia punctata, Stereum hirsutum, Botryosphaeria dothidea y stevensii, Phomopsis viticola, Botrytis cinerea, Sclerotinia minor, sclerotiorum et cepivorum, Microdochium nivale, Armillaria mella, Phomopsis hélianthe.

15. Utilización de la cepa de Trichoderma atroviride AGR2 según la reivindicación 1 u obtenida según el método de una de las reivindicaciones 2 a 8, como producto destinado a la estimulación de las raíces, la germinación y el crecimiento de las plantas, en particular las de lechugas.

16. Utilización de la cepa de Trichoderma atroviride AGR2 según la reivindicación 1 u obtenida según el método de una de las reivindicaciones 2 a 8, como elemento colonizador de la madera en los primeros centímetros.