

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 004**

51 Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

A23B 7/155 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2002 E 02725130 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 1372384**

54 Título: **Levadura antagonista novedosa útil para controlar el deterioro de productos agrícolas, métodos de uso de la misma y composiciones que la contienen**

30 Prioridad:

14.03.2001 US 275526 P

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

16.04.2013

73 Titular/es:

**THE STATE OF ISRAEL-MINISTRY OF
AGRICULTURE (100.0%)
AGRICULTURAL RESEARCH ORGANIZATION,
THE VOLCANI CENTER, P.O. BOX 6
50250 BEIT-DAGAN, IL**

72 Inventor/es:

DROBY, SAMIR

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 401 004 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

Levadura antagonista novedosa útil para controlar el deterioro de productos agrícolas, métodos de uso de la misma y composiciones que la contienen

5 La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 60/275.526 presentada el 14 de marzo de 2001.

CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a una levadura antagonista novedosa útil para controlar el deterioro de productos agrícolas, a métodos de uso de la misma y a composiciones que la contienen. En concreto, la presente invención se refiere a la levadura *Metschnikowia fructicola* y al uso de la misma para inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados en una parte de una planta, por ejemplo, hojas, flores, frutos, raíces u hortalizas.

15 Uno de los problemas más graves en la industria de producción moderna (de frutas, hortalizas y flores) es la descomposición o el deterioro de los productos después de la cosecha. Se estima que las pérdidas poscosecha de frutas y hortalizas son del 50%. Esta pérdida es atribuible en gran medida a infecciones fúngicas y bacterianas. En los países en vías de desarrollo, las pérdidas poscosecha suelen ser graves debido a la falta de instalaciones de almacenamiento refrigeradas y una manipulación adecuadas. Aunque las naciones desarrolladas tienen refrigeración adecuada, los consumidores de estos países adquieren a menudo productos que han sido enviados desde grandes distancias y almacenados durante periodos de tiempo prolongados. La descomposición poscosecha de frutas y hortalizas puede atribuirse a infecciones que se producen entre la floración y la maduración del fruto o durante la recolección y la posterior manipulación y almacenamiento.

20 Los fungicidas sintéticos tales como imazalil y tiabendazol (TBZ) han sido tradicionalmente el principal medio de controlar la pérdida poscosecha de los productos. Sin embargo, existe una creciente presión mundial para reducir el uso de productos químicos tóxicos en la industria alimentaria. Los consumidores están preocupados por los residuos químicos en frutas y hortalizas en general, y se sienten especialmente incómodos con la idea de la aplicación en poscosecha de productos químicos.

25 Además, los ecologistas son cada vez más insistentes sobre la eliminación de plaguicidas químicos y los niveles de residuos químicos en los productos frescos.

30 Al mismo tiempo, han aparecido cepas de patógenos resistentes a los fungicidas para los fungicidas más utilizados (por ejemplo, TBZ, imazalil, Rovral). Por último, algunos de los fungicidas más eficaces tales como Captan y Benlate han sido eliminados del registro y ya no están disponibles. Además, el tratamiento poscosecha de algunos tipos de productos no está permitido. Además, gran parte del deterioro poscosecha es el resultado de patógenos que colonizaron el producto antes de la cosecha.

35 Todos estos factores han contribuido a aumentar el interés por el desarrollo de alternativas eficaces que no planteen ningún riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Se ha propuesto el uso de enfoques biológicos en las plantas tales como compuestos naturales, resistencia inducida y microorganismos antagonistas como alternativas potenciales a los fungicidas sintéticos para la prevención o el control de la descomposición de los productos agrícolas.

40 Los compuestos naturales son por lo general costosos de producir y de eficacia limitada. De los enfoques biológicos, son los menos prometedores.

45 La resistencia inducida resulta muy prometedora en teoría, pero adolece de dos problemas en otros casos en los que se ha probado. La resistencia inducida en base a organismos genéticamente modificados (OGM) ha tenido a menudo resultados decepcionantes porque los patógenos mutan cuando se utilizan ampliamente los OMG en el campo. Sin embargo, el problema más complicado con los OMG ha demostrado ser la resistencia a los OMG en general por parte de los consumidores y los ecologistas.

50 Esto deja el desarrollo de microorganismos antagonistas como el enfoque biológico "aceptable" que queda.

55 En los últimos años, la investigación sobre el uso de agentes microbianos de control biológico para el control de enfermedades de poscosecha de frutas ha ganado una considerable atención y se ha trasladado del laboratorio a la aplicación comercial. A partir de estos esfuerzos, ya está disponible una gran cantidad de información relativa al uso de agentes microbianos de control biológico para controlar las enfermedades de poscosecha (Droby *et al.*, 2001). La selección de supuestos antagonistas microbianos se ha basado principalmente en la capacidad de los antagonistas para colonizar rápidamente las superficies de las frutas y las heridas, competir con el patógeno por los nutrientes, y sobrevivir y desarrollarse en una amplia variedad de condiciones de temperatura. No se han caracterizado anteriormente antagonistas que puedan utilizarse en presencia de productos químicos agrícolas, incluyendo los antibióticos.

60

65

Se ha desarrollado una técnica de cribado simple y fiable para la selección de antagonistas que utiliza el sitio de la herida como medio selectivo. Utilizando estos procedimientos y otros protocolos comparables, se han aislado varias levaduras, hongos filamentosos y bacterias antagonistas, y han demostrado proteger una variedad de productos cosechados incluyendo cítricos y frutas de pepita contra la descomposición poscosecha (Droby *et al.*, 1989; Janisiewicz y Roitman, 1988; Chalutz y Wilson, 1990; Roberts, 1990; Droby *et al.*, 1991; Gullino *et al.*, 1991; Janisiewicz, 1994; Lurie *et al.*, 1995; Chand-Goyal y Spotts, 1996; El Ghaouth *et al.*, 1998; Ippolito *et al.*, 2000).

El éxito de algunos de estos antagonistas microbianos en los estudios de laboratorio y a gran escala ha generado el interés de varias compañías agroquímicas por el desarrollo y promoción de productos biológicos de poscosecha para el control de las podredumbres en las frutas y hortalizas. Se han patentado y evaluado una serie de antagonistas microbianos para su uso comercial en el tratamiento poscosecha de los productos. En la actualidad, están disponibles en el mercado cuatro microorganismos antagonistas, dos levaduras, *Candida oleophila* y *Cryptococcus albidus*, y dos cepas de una bacteria, *Pseudomonas syringae*, con los nombres comerciales de ASPIRE, YieldPlus, y BIOSAVE-110 y BIOSAVE-111, respectivamente.

Las patentes que describen el uso de bacterias y levaduras para el control biológico de enfermedades fúngicas de productos agrícolas incluyen las patentes de EE.UU. n^{os} 5.314.691 (Coffey *et al.*); 5.270.059 (Janisiewicz *et al.*); 5.266.316 (Elad *et al.*); 5.244.680 (Roberts); 5.238.690 (Elad *et al.*); 5.041.384 (Wilson y Chalutz); 5.711.946 (Goyal y Roberts) y las publicaciones PCT WO 92/18009 (Shanmuganathan) y WO 91/01641 (Wilson *et al.*). Cada una de estas doctrinas de la técnica anterior se define estrictamente como una composición o un método que contiene/que emplea una especie o cepa de bacteria, hongo o levadura divulgada. Ninguna de estas doctrinas incluye un microorganismo que haya demostrado ser eficaz contra una amplia variedad de hongos patógenos en una amplia variedad de productos agrícolas. Además, ninguna de estas patentes contiene una referencia indirecta o sugerencia de que las levaduras del género *Metschnikowia* sean útiles para prevenir la pérdida poscosecha de productos.

Se sabe que *Metschnikowia pulcherrima* tiene alguna eficacia en el control biológico en la fruta de algunos microorganismos nocivos (DeCurtis *et al.* (1996) Ann. Microbiol. Enzymol. 46:45-55 y Piano *et al.* (1997) Postharvest Biol. Technol. 11:131-140), sin embargo es una especie separada y distinta de *Metschnikowia fructicola*. Además, el espectro aparentemente limitado de actividad antagonista de *Metschnikowia pulcherrima* la hace poco adecuada para su uso en la industria de productos agrícolas. Hasta ahora, se ha demostrado sólo un espectro limitado de actividad de control biológico para *M. pulcherrima*. Esto la hace poco adecuada para la prevención comercial pre- y poscosecha en una amplia variedad de situaciones agrícolas.

Existe por tanto una necesidad ampliamente reconocida de, y resultaría altamente ventajoso contar con, una levadura antagonista novedosa útil para controlar el deterioro de los productos agrícolas, métodos de uso de la misma y composiciones que la contengan desprovistas de las limitaciones anteriores.

RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un cultivo biológicamente puro de una levadura de la especie *Metschnikowia fructicola* identificada como NRRL Y-27328, sustituido actualmente por Y-30752, el cultivo capaz de inhibir competitivamente el crecimiento de un microorganismo nocivo en una parte de una planta a la que se aplica una cantidad biológicamente eficaz del cultivo, *Metschnikowia fructicola* (MF), se denomina en el presente documento cepa #277 y se ha depositado en la colección de cultivos NRS (NRRL) Centro Nacional para la Investigación de Utilización Agrícola, Peoria, Illinois, EE.UU., donde se le ha asignado el número de depósito NRRL Y-27328, sustituido actualmente por Y-30752. Este depósito se ha realizado de conformidad con los términos del Tratado de Budapest.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para su uso en la protección de productos agrícolas que comprende, como ingrediente activo, una cantidad biológicamente eficaz de levadura de *Metschnikowia fructicola* biológicamente pura que posee todas las características identificativas del cultivo biológicamente puro según la reivindicación 1, conteniendo adicionalmente la composición un vehículo.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de inhibición del crecimiento de un microorganismo nocivo en una parte de una planta, comprendiendo el método aplicar por lo menos una vez una cantidad agrícola eficaz de cultivo biológicamente puro de una levadura de la especie *Metschnikowia fructicola* identificada como NRRL Y-30752 a la parte de una planta. La aplicación puede ser antes de la cosecha, concurrente con la cosecha o en poscosecha.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envasado y una composición identificada para su uso en la protección de productos agrícolas frente a un microorganismo nocivo que comprende como ingrediente activo, una cantidad biológicamente eficaz de levadura biológicamente pura de la especie *Metschnikowia fructicola* que posee todas las características identificativas del cultivo biológicamente puro según la reivindicación 1, conteniendo adicionalmente la composición un vehículo.

De acuerdo con otras características de las formas de realización preferentes de la invención que se describen más

- adelante, se proporciona una cepa biológicamente pura de *Metschnikowia fructicola* que posee todas las características identificativas del cultivo biológicamente puro de NRRL Y-27328, sustituido actualmente por Y-30752. De acuerdo con otras características más de las formas de realización preferentes descritas, se proporciona un mutante biológicamente puro de *Metschnikowia fructicola*, que posee todas las características identificativas del cultivo biológicamente puro de NRRL Y-27328, sustituido actualmente por Y-30752. De acuerdo con otras características más de las formas de realización preferentes descritas, el microorganismo nocivo está seleccionado del grupo que consiste en *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria spp.*, *Molinitia spp.* y *Fusarium spp.*
- De acuerdo con otras características más de las formas de realización preferentes descritas, la parte de una planta está seleccionada del grupo que consiste en un fruto con hueso, una fruta de pepita, un cítrico, uvas, una hortaliza, un bulbo floral, una hierba, una grano, una raíz, una hoja y bayas.
- De acuerdo con otras características más en las formas de realización preferentes descritas, la levadura se suministra en un estado fisiológico seleccionado del grupo que consiste en activo y latente.
- De acuerdo con otras características más de las formas de realización preferentes descritas, la levadura se suministra en una forma física seleccionada de entre una suspensión líquida, una emulsión, un polvo, gránulos, un liofilizado y un gel.
- De acuerdo con otras características más de las formas de realización preferentes descritas, la composición incluye adicionalmente un antibiótico químico.
- De acuerdo con otras características más de las formas de realización preferentes descritas, el antibiótico químico es un fungicida o un agente antimicrobiano o un plaguicida.
- De acuerdo con otras características más de las formas de realización preferentes descritas, el fungicida incluye por lo menos un producto químico seleccionado del grupo que consiste en Iprodiona, Tiabendazol, Imazalil (1-(2-2,4-diclorofenil)-2(2-propeniloxi-etil)-1H-imidazol), Fenhexamida, Pirimetamil y una combinación de Fludioxonil y Ciprodinilo (por ejemplo, Rovral, TBZ, Imazalil, Teldor, Mitos o Switch).
- De acuerdo con otras características más de las formas de realización descritas, la levadura de la especie *Metschnikowia fructicola* posee todas las características identificativas de la especie *Metschnikowia fructicola* identificada como NRRL Y-27328, sustituido actualmente por Y-30752, o de cualquier cepa de la misma o de cualquier mutante de dicha cepa.
- De acuerdo con otras características más de las formas de realización preferentes descritas, el artículo de fabricación incluye adicionalmente un aplicador diseñado y construido para aplicar la levadura a la producción agrícola.
- La presente invención aborda satisfactoriamente las deficiencias de las configuraciones conocidas actualmente al proporcionar una levadura antagonista novedosa del género *Metschnikowia* útil para el control del deterioro de muchos tipos de productos agrícolas debido a un amplio espectro de microorganismos. La presente invención proporciona adicionalmente métodos de uso de la levadura, composiciones que contienen la levadura y artículos de fabricación que contienen las composiciones. Se espera que la presente invención goce de gran aceptación debido a que puede proporcionar una producción poscosecha a partir de una aplicación antes de la cosecha.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La invención se describe en el presente documento, sólo a modo de ejemplo, con respecto a los dibujos adjuntos. Haciendo a continuación referencia específica a los dibujos en detalle, se subraya que los datos mostrados son a modo de ejemplo y para fines de análisis ilustrativo de las formas de realización preferentes de la presente invención solamente, y se presentan para proporcionar lo que se cree es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se intentan mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, la descripción junto con los dibujos haciendo evidente, para los expertos en la materia, cómo pueden materializarse en la práctica las diversas formas de la invención. En los dibujos:
- La Fig. 1 es un gráfico del número de células en función del tiempo para las levaduras *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención y *Metshnikowia reukafii* (231) y *Kluyveromyces thermotolerance* (414) incubadas a 4°C, que indica que Mf crece más rápido que otras levaduras a bajas temperaturas.
- La Fig. 2 es un gráfico de las unidades formadoras de colonias (ufc) por herida en función del tiempo para la levadura *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención en las heridas de la superficie de los cítricos.
- La Fig. 3 es un histograma que ilustra la reducción del % de descomposición, debida a la infección por *Penicillium digitatum* (Pd) del pomelo rojo, por la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención y el efecto de la adición de nutrientes exógenos obtenidos de la cáscara de pomelo macerada.

La Fig. 4 es un histograma que ilustra que la respuesta de la descomposición por moho verde debido a *P. digitatum* en el pomelo, a la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención, es dependiente de la concentración.

La Fig. 5 es una foto de placas de Petri que ilustra la ausencia de inhibición a larga distancia de diferentes patógenos de poscosecha por la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención en un medio de crecimiento sólido.

La Fig. 6 es un histograma que ilustra la correlación entre la actividad quitinolítica de la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención y los aislados de levadura #47 y #273 con su actividad de control biológico contra *Penicillium expansum* en manzanas. El recuadro muestra que la levadura Mf produce cantidades elevadas de quitinasas comparada con los demás aislados de levaduras.

La Fig. 7 es un histograma que ilustra el efecto sinérgico de la levadura *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención con el fungicida Rovral (Iprodiona) contra *Botrytis cinerea* de uvas de mesa.

La Fig. 8 es un gráfico de las ufc en función del tiempo para la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención con diversos fungicidas utilizados para el control de *Botrytis cinerea* y *Penicillium* sp. Los datos presentados indican que Mf es compatible con/no se ve influida por los fungicidas sometidos a ensayo.

La Fig. 9 es un gráfico de las ufc/baya en función del tiempo para la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención, *Metschnikowia reukafii* (231) y *Kluyveromyces thermotolerance* (414) en uvas de mesa (variedad Superior) entre la aplicación en el campo y la cosecha.

La Fig. 10 es un histograma que compara el efecto de la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención con otros aislados de levaduras sobre el deterioro de las uvas de mesa debido a *Aspergillus niger*.

La Fig. 11 es un histograma que compara el efecto de la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención con otros aislados de levaduras sobre el deterioro debido a *Botrytis* de uvas de mesa en un ensayo de laboratorio.

Las Figs. 12 A y B son histogramas del índice de enfermedad y del % de racimos descompuestos, respectivamente, y el efecto de la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención a una concentración de 10^8 células/ml aplicada en los campos en comparación con los testigos no tratados y las uvas tratadas químicamente. Se muestra el crecimiento de los patógenos *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Botrytis*.

Las Figs. 13 A y B son histogramas del índice de enfermedad y del % de racimos descompuestos respectivamente, como resultado de la infección por *Rhizopus* en el campo y el efecto de la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención comparado con *M. raufauilli* y *K. thermotolerance*.

La Fig. 14 es un histograma que muestra las bayas descompuestas/3 kg. para las no tratadas (control) y las uvas tratadas en el campo con la *Metschnikowia fructicola* (10^8 células/ml (MF) y 10^7 células/ml (MF¹)) de la presente invención. La descomposición fue debida a *Botrytis cinerea*, que se desarrolló después de la cosecha.

La Fig. 15 es un histograma que muestra las bayas descompuestas/kg como resultado del almacenamiento comparando las no tratadas (control) y las uvas tratadas con la *Metschnikowia fructicola* (10^8 (MF) células/ml y 10^7 (MF¹) células/ml) de la presente invención. La descomposición fue debida a *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger*.

La Fig. 16 es un histograma que compara la eficacia de la levadura *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención con *Metschnikowia reukafii* (231) y *Kluyveromyces thermotolerance* (414) y Mitos en el control de daños a las uvas en el campo debidos a los patógenos *Aspergillus* y *Botrytis* y *Rhizopus*.

Las Figs. 17 A y B son histogramas que ilustran la eficacia de la levadura *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención, en comparación con *C. oleophila* y *B. subtilis*, en el control de la podredumbre por *Fusarium oxysporum* en los bulbos de lirio blanco.

Las Figs. 18 A y B son histogramas que ilustran la eficacia de la levadura *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención, en comparación con *C. oleophila* y *B. subtilis*, en el control de podredumbre por *Penicillium hirsutum* en los bulbos de lirio blanco.

La Fig. 19 es un histograma que ilustra el porcentaje total de descomposición por la infección natural de nectarinas con diversos patógenos durante el almacenamiento a 0°C durante 30 días y 10 días adicionales de almacenamiento a temperatura ambiente en presencia de la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención o de *Candida oleophila*.

La Fig. 20 es un histograma que ilustra el % de heridas infectadas después de la infección artificial de nectarinas con *Penicillium expansum* en presencia de la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención o de *Candida oleophila*.

La Fig. 21 es un histograma que ilustra que el porcentaje de heridas infectadas por infección artificial de nectarinas con *Penicillium expansum* disminuye proporcionalmente a la dosis aplicada de la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención.

La Fig. 22 es un histograma que ilustra que el porcentaje total de descomposición de las manzanas después de la infección artificial con *Penicillium expansum* varía con la concentración aplicada de la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención.

Las Figs. 23 A y B son un gráfico y un histograma respectivamente, que ilustran el efecto de la aplicación antes de la cosecha de la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención sobre el desarrollo de la podredumbre de fresas por *Botrytis* en el campo (23A) y durante el almacenamiento poscosecha (23B). Teldor 50% (formulación en polvo WG) - 0,15%; Teldor 500 (formulación líquida - 0,15%; Switch - 0,06% (60 g/dunam); Switch 0,1% (100 g/dunam)

La Fig. 24 es una serie de histogramas que ilustra el % de descomposición total de descomposición por moho verde en pomelos en presencia o ausencia de la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención o de *Metschnikowia raukafii* (231) o de *Candida oleophila* (182).

5 La Fig. 25 es un histograma que muestra la dependencia de la concentración del % de descomposición de los tomates Cherry infectados artificialmente con *Botrytis cinerea*, respecto a la *Metschnikowia fructicola* (Mf) aplicada.

10 La Fig. 26 es un histograma del % de frutas descompuestas que ilustra la capacidad de la *Metschnikowia fructicola* (Mf; 10^8 células/ml) de la presente invención y de *C. oleophila* para reducir la descomposición natural por (*Botrytis cinerea*) en las cerezas dulces durante y después del almacenamiento en frío (30 días a 0°C y después de 4 días más de almacenamiento a 24°C).

La Fig. 27 es un histograma que ilustra el % de descomposición por *Botrytis cinerea* (5×10^4 esporas/ml) en los tomates Cherry en presencia o ausencia de la *Metschnikowia fructicola* (Mf) de la presente invención y a diferentes temperaturas de almacenamiento.

15 DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERENTES

La presente invención se refiere a una nueva especie de levadura *Metschnikowia fructicola* que se puede aplicar a productos agrícolas para reducir la descomposición precosecha y poscosecha a través de la inhibición competitiva de una amplia variedad de microorganismos. La *Metschnikowia fructicola* se denomina en el presente documento cepa #277 y/o Mf, y ha sido depositada en la colección de cultivos NRS (NRRL) Centro Nacional para la Investigación de Utilización Agrícola, Peoria, Illinois, EE.UU., donde se le ha asignado el número de depósito NRRL Y-27328, sustituido actualmente por Y-30752. Este depósito se ha realizado de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest.

25 En concreto, la presente invención se puede utilizar para reducir la incidencia y/o la gravedad de hongos patógenos en uvas, cítricos, frutas de pepita, fruto con hueso, fresas, bulbos florales, hortalizas, raíces, granos, follaje y hierbas.

30 "Uvas", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, incluye uvas de mesa y uvas de vinificación.

"Cítrico", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, incluye, pero no se limita a, naranjas, pomelos, mandarinas, clementinas, limones, limas, naranja china, cidra, pomelo, mandarina e híbridos derivados de las mismas.

35 "Fruta de pepita", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, incluye, pero no se limita a, manzanas, peras y membrillos.

40 "Fruto con hueso", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, incluye, pero no se limita a, melocotones, ciruelas, nectarinas, albaricoques, mangos.

45 Para los fines de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, los términos "inhibir" o "inhibición" se refieren a un retardo o retraso de un proceso. Como tal, se puede considerar que la inhibición se produce si el proceso tiene lugar a una velocidad reducida como resultado de la aplicación de una levadura reivindicada, una composición que contiene dicha levadura, o como resultado de la práctica de un método reivindicado.

50 La invención se refiere adicionalmente a métodos de uso de la levadura reivindicada, a composiciones que contienen la levadura reivindicada y a artículos de fabricación que incluyen esas composiciones. Los principios y el funcionamiento de la protección de los productos agrícolas frente a la descomposición no deseada a través de la inhibición competitiva de acuerdo con la presente invención se pueden entender mejor con respecto a las figuras y las descripciones adjuntas.

55 Antes de explicar en detalle por lo menos una forma de realización de la invención, debe entenderse que la invención no se limita en su aplicación a los detalles de construcción y a la disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención es susceptible de otras formas de realización o de ser practicada o llevada a cabo de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en el presente documento tienen fines descriptivos y no deben considerarse limitativas.

60 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un cultivo biológicamente puro de una levadura de la especie *Metschnikowia fructicola* identificada como NRRL Y-27328, sustituido actualmente por Y-30752. Este cultivo es capaz de inhibir competitivamente el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos nocivos en una parte de una planta a la que se aplica una cantidad biológicamente eficaz del cultivo. Las características identificativas de *Metschnikowia fructicola* se exponen en "*Metschnikowia fructicola*, a New Ascoropic Yeast with Potential for Biocontrol of Postharvest Fruit Rots" (Kurtzman y Droby (2001) System Appl. Microbiol 24: en prensa). En resumen, NRRL Y-27328, sustituido actualmente por Y-30752, se diferencia de otros miembros del género *Metschnikowia* en el dominio D1/D2 de la secuencia del 26S ADN. En concreto, NRRL Y-27328, sustituido actualmente por Y-30752, se diferencia en un 2,2% de *Metschnikowia pulcheirna*, que es su pariente más cercano conocido. Está bien establecido que son suficientes diferencias del 1% para la diferenciación entre especies

(Kurtzman y Robnett (1998) Antonie Leeuwenhoek 73:331-371). Por lo tanto, una *Metschnikowia* que se diferencie de Mf en menos del 1% en el dominio D1/D2 de la secuencia del 26S ADNr se considera dentro del alcance de la presente invención.

5 Por lo tanto, cualquier cepa biológicamente pura de *Metschnikowia fructicola*, se derive físicamente del depósito original o se aísle independientemente, forma parte de la presente invención mientras posea todas las características identificativas de NRRL Y-27328, sustituido actualmente por Y-30752. Esto incluye mutantes biológicamente puros de *Metschnikowia fructicola*, mientras se conserven todas las características identificativas de NRRL Y-27328, sustituido actualmente por Y-30752. Para los fines de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "mutante" incluye una mutación que se produce de forma natural y las modificaciones genéticas intencionadas tales como la introducción de mutaciones puntuales, plásmidos, fagos, fagémidos, cósmidos y cromosomas artificiales.

10 El microorganismo nocivo del que protege Mf incluye, pero no se limita a, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium expansum*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria spp.*, *Molinilia spp.* y *Fusarium spp.*

15 La presente invención se materializa adicionalmente en una composición para su uso en la protección de productos agrícolas. La composición incluye, como ingrediente activo, una cantidad biológicamente eficaz de levadura de *Metschnikowia fructicola* biológicamente pura que posee todas las características identificativas del cultivo biológicamente puro según la reivindicación 1. La composición contiene adicionalmente un vehículo. Como se ilustra en los ejemplos que se exponen más adelante en el presente documento, *Metschnikowia fructicola* es biológicamente eficaz cuando se administra a una concentración superior a 10^6 células/ml, preferentemente superior a 10^7 células/ml, más preferentemente a 10^8 células/ml, lo más preferentemente a 10^9 células/ml o más.

20 La levadura de la composición se puede suministrar en cualquier estado fisiológico, tal como activo o latente. La levadura en estado latente se puede suministrar, por ejemplo, congelada (por ejemplo, en DMSO/glicerol), secada o liofiliza. Además, la levadura de la composición se puede suministrar en cualquier forma física, incluyendo, pero sin limitarse, a una suspensión líquida, una emulsión, un polvo, gránulos, un liofilizado o un gel.

25 La composición se puede aplicar como aerosol o líquido para el suelo, o como un ungüento o polvo aerosolizado. Si la composición incluye levadura en estado latente, puede requerir una reactivación antes de su uso, por ejemplo, por rehidratación e incubación en un medio nutritivo. Preferentemente, la levadura en estado latente, se activará al ser aplicada o después de la aplicación.

30 Con el fin de aumentar la eficacia global de la composición, se puede incluir adicionalmente un antibiótico químico. Preferentemente, el antibiótico químico es un fungicida compatible, por ejemplo Iprodiona (por ejemplo Rovral) o Tiabendazol (por ejemplo, Apl-Luster, Arbotect, Mertect, Mycozol, TBZ, Tecto y Tiabendazol), Imazalil (es decir, 1-(2-(2,4-diclorofenil)-2(2-propeniloxi-etil)-1H-imidazol; por ejemplo Bromazil, Deccoil, Fungaflo, Freshgard, o Fungazil), Fenhexamida (por ejemplo Teldor), Pirimetamil (por ejemplo Mito) o una combinación de Fludioxonil y Ciprodinilo (por ejemplo Switch) o un equivalente químico de los mismos o una combinación que los incluya. Como alternativa, o adicionalmente, el antibiótico químico incluye un agente antimicrobiano o un plaguicida.

35 La invención se materializa adicionalmente en un método de inhibición del crecimiento de un microorganismo nocivo en una parte de una planta, el método incluye aplicar por lo menos una vez una cantidad agrícola eficaz de un cultivo biológicamente puro de una levadura de la especie *Metschnikowia fructicola* identificada como NRRL Y-30752 a la parte de una planta. Preferentemente, la levadura de la especie *Metschnikowia fructicola* posee todas las características identificativas de la especie *Metschnikowia fructicola* identificada como NRRL Y-27328, sustituido actualmente por Y-30752, o de cualquier otra cepa de la misma o de cualquier mutante de dicha cepa.

40 La invención se materializa adicionalmente en un artículo de fabricación que comprende material de envasado y una composición identificada para su uso en la protección de productos agrícolas frente a un microorganismo nocivo. El artículo de fabricación incluye, como ingrediente activo, una cantidad biológicamente eficaz de levadura biológicamente pura de la especie *Metschnikowia fructicola* que posee todas las características identificativas del cultivo biológicamente puro según la reivindicación 1, y contiene adicionalmente un vehículo. Preferentemente, el artículo de fabricación incluye adicionalmente un aplicador diseñado y construido para aplicar la levadura a la producción agrícola. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, el término "vehículo" se refiere a cualquier sustancia o diluyente que no provoca irritación significativa a las plantas o a los productos agrícolas y no anula la actividad biológica y las propiedades del ingrediente activo administrado. Como tal, el término incluye específicamente, pero no se limita a, soluciones acuosas tales como medios de cultivo, polvos inertes, y disolventes inertes (por ejemplo agua).

45 Preferentemente, la levadura biológicamente pura de la especie *Metschnikowia fructicola* incluida en el artículo de fabricación se identifica como NRRL Y-30752. En otra forma de realización preferente, la levadura biológicamente pura de la especie *Metschnikowia fructicola* incluida en el artículo de fabricación es un mutante que posee todas las características identificativas del cultivo biológicamente puro según la reivindicación 1.

Se espera que la especie de levadura, las composiciones y los artículos de fabricación que las incluyen y los métodos de uso de los mismos reivindicados encuentren gran utilidad en la agricultura comercial. Su utilidad se deriva de su amplio espectro de actividad contra los patógenos importantes y de la amplia variedad de plantas/frutas a las que se pueden aplicar de manera eficaz. Además, Mf puede aplicarse en el campo, o concurrentemente con la cosecha, o durante el almacenamiento. Además, como se demuestra en los ejemplos que se presentan más adelante en el presente documento, Mf es útil en una amplia variedad de condiciones de almacenamiento. Por lo tanto, la presente invención permite la aplicación antes de la cosecha de una levadura benigna como medio de prevenir la descomposición poscosecha de la producción agrícola.

Otros objetos, ventajas y características novedosas de la presente invención se pondrán de manifiesto para un experto en la materia tras el examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos. Además, cada una de las diversas formas de realización y aspectos de la presente invención como se han definido anteriormente en el presente documento y como se reivindican en la sección de las reivindicaciones que se presenta más adelante, encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitativa.

Generalmente, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas están explicadas detalladamente en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, RM, ed. (1994), Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (Eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como las expuestas en las patentes de EE.UU. n^{os} 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan por referencia en el presente documento como si se expusieran completamente. A lo largo del presente documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos en los mismos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector. Toda la información contenida en los mismos se incorpora en el presente documento por referencia.

EJEMPLO 1

Aislamiento de Metschnikowia fructicola

Se aisló la novedosa especie de levadura *Metschnikowia fructicola* de la superficie de bayas de uva (variedad Superior) cultivadas en la parte central de Israel. En diversas fases, se sumergieron bayas individuales en agua destilada estéril en vasos de precipitados de 100 ml y se agitaron vigorosamente durante 2 horas en agitador rotatorio a 120 rpm. Se separaron alícuotas de 100 µl del líquido de lavado y se sembraron en medio PDA (agar de dextrosa de patata; DIFCO Laboratories, EE.UU.). Después de 4-5 días de incubación, se recogieron al azar colonias de levadura de acuerdo con las características de las colonias (color y morfología) y se sembraron en estrías individualmente en medio fresco para obtener cultivos biológicamente puros. Los cultivos se purificaron adicionalmente mediante siembra por estrías repetida en PDA. La identificación y la caracterización de la nueva especie se realizaron en el Microbial Genomics and Bioprocessing Center, USDA-ARS, Peoria, IL, EE.UU. La *Metschnikowia fructicola* se depositó en el NRRL con el número Y-27328, sustituido actualmente por Y-30752.

EJEMPLO 2

Propagación de Metschnikowia fructicola

Metschnikowia fructicola se propaga en condiciones aerobias a temperaturas que oscilan entre 5°C y 37°C. La temperatura óptima de crecimiento es de 20°C-27°C. El crecimiento se da en medio líquido (caldo nutritivo; Droby *et al.*, 1989) con un pH neutro. La densidad de células de la levadura alcanza su crecimiento máximo (fase estacionaria) a las 24-48 horas. Para ensayos de laboratorio y a pequeña escala, resulta adecuado el crecimiento en matraces Erlenmeyer que contengan el medio y agitados en un agitador rotatorio. Para ensayos comerciales y a gran escala, resultan preferentes tanques de fermentación y medios de crecimiento industrial. Las células de levadura se recogen por centrifugación utilizando centrifugas de laboratorio o industriales convencionales. Un

experto en la materia del cultivo de fermentación será capaz de aumentar a escala los volúmenes de cultivo utilizando medios de crecimiento adecuados y equipos disponibles en el mercado.

EJEMPLO 3

5

Ensayo de Laboratorio de la actividad de *Metschnikowia fructicola* en uvas y tomates Cherry

10

15

20

Se separaron tomates Cherry o uvas individuales de los racimos. La desinfección de la superficie se logró por inmersión durante 1 minuto en hipoclorito de sodio al 1% (v/v) (pH 11,5). Los frutos desinfectados se montaron en tiras de cinta adhesiva pegadas a almohadillas de PVC dentro de una caja de incubación. Se pincharon los frutos con un alfiler hasta una profundidad de 2 mm y se pipetearon 10 µl de una suspensión de células antagonistas (*Metschnikowia fructicola* o como se ha indicado) sobre el sitio de la herida y se dejó secar durante 1-2 horas. A continuación se inocularon los frutos con 10 µl de suspensión de conidios de un patógeno fúngico adecuado (*B. cinerea* o como se ha indicado). Las suspensiones de conidios se obtuvieron a partir de cultivos de patógenos de una semana de antigüedad, incubados a temperatura ambiente. La concentración de esporas se ajustó a $1-5 \times 10^4$ conidios/ml. Cada tratamiento se aplicó a tres repeticiones de 7-10 frutos individuales. Después del tratamiento, se colocó papel de filtro húmedo en las cajas de incubación, que se cubrieron con polietileno para mantener una humedad relativa elevada. Se evaluó el porcentaje de bayas/frutos descompuestos en cada repetición después de 4-5 días a 20°C. Este ensayo se empleó en los Ejemplos 16, 17, 26 y 28 que se describen más adelante.

EJEMPLO 4

25

Ensayo de campo de la actividad de *Metschnikowia fructicola* en uvas

30

Se evaluó la eficacia de *Metschnikowia fructicola* y de otras de levaduras antagonistas contra la podredumbre del racimo de uvas de mesa y de vinificación en diferentes variedades de uvas en viñedos situados en las llanuras costeras del norte, centro y sur de Israel. Se sometieron a ensayo "Thompson Seedless" y "Superior Seedless" (uvas de mesa) y "Sauvignon blanc" (uvas de vinificación). Las parcelas experimentales consistían en una a siete parras por tratamiento en los diferentes experimentos, dispuestas como bloques al azar con por lo menos cuatro repeticiones. La levadura antagonista y los estándares químicos (Mitos 0,25%) se aplicaron semanalmente hasta 4 veces, hasta el punto de goteo, con un pulverizador de mochila accionado manualmente.

35

40

La incidencia de la descomposición (% de racimos descompuestos) en los experimentos con uvas en el campo se determinó el día de la cosecha (evaluación de campo). Se tomaron muestras de cuarenta racimos de cada parcela y se clasificaron de acuerdo con el agente causal de la descomposición y el porcentaje de podredumbre. Para las uvas de mesa, la podredumbre se evaluó también en almacenamiento. Se recolectaron aproximadamente 3 kg-5 kg de uvas de cada parcela y se envasaron en bolsas de plástico que fueron envueltas en bolsas de polietileno para crear una humedad relativa elevada. Se evaluó el desarrollo de podredumbre después de 3-4 semanas de almacenamiento a 0°C, seguido de 4-7 días a 20°C (almacenamiento en frío) o durante 10 días a 20 (vida útil). Se utilizó tratamiento estándar con SO₂ como comparación. Los datos resumidos en las Figuras 12A y B indican que Mf es comparable en su eficacia al antifúngico químico.

45

EJEMPLO 5

***Metschnikowia fructicola* inhibe la descomposición de las cerezas dulces**

50

55

Se sometió a ensayo el efecto de las levaduras antagonistas *Metschnikowia fructicola* (MF) de la presente invención y *Candida oleophila* (I-182) sobre el desarrollo de la descomposición poscosecha en las cerezas dulces, a una concentración de 10^8 células/ml. Las cerezas se sumergieron durante 1 minuto en suspensiones de células de levadura, se dejaron secar al aire y a continuación se almacenaron en diversas condiciones: hasta 6 días a 24°C; 30 días a 0°C seguido de 4 días en vida útil (temperatura ambiente); y 30 días a 0°C con envasado en atmósfera modificada (MA) (P-Plus, Sidlaw Packaging, Bristol-UK), seguido de 4 días de vida útil. La atmósfera en la bolsa utilizada para el envasado en MA se determinó separando una alícuota de aire e inyectándolo en un cromatógrafo de gases GC con un detector TDC y una columna de Poropak (Supelco, Bellepenta, PA, EE.UU.). El número de bayas descompuestas se determinó siguiendo el período de vida útil y almacenamiento. Los datos, resumidos en la figura 26, indican que Mf es más eficaz que *Candida oleophila*.

60

EJEMPLO 6

Características de crecimiento de *Metschnikowia fructicola* en refrigeración

65

Con el fin de demostrar que Mf es útil en condiciones de almacenamiento en frío, se cultivaron células de levadura en matraces Erlenmeyer (50 ml de medio/matraces de 100 ml) que contenían medio líquido que consistía en caldo nutritivo, extracto de levadura y D-glucosa (NYDB: Drobj. *et al.*, 1989) en agitadores rotatorios colocados en sala fría a 4°C. Se retiraron asépticamente alícuotas (1 ml) del medio de crecimiento a intervalos de 1 día, se realizaron

diluciones seriadas y se sembraron en medio sólido (NYDA: Droby *et al.*, 1989). Después de 3-4 días de incubación a 25°C se contaron el número de colonias en crecimiento sobre el medio y se expresó como número Log de células/ml. Los datos se resumen en la Figura 1. Mf creció mucho más rápido que *M. reukaufii* o *K. thermotolerance* durante 6 días en refrigeración. Esto indica que MF es más adecuada para el control biológico de la podredumbre poscosecha en condiciones de almacenamiento en frío que *M. reukaufii* o *K. thermotolerance*.

EJEMPLO 7

***Metschnikowia fructicola* coloniza las heridas en la cáscara de los cítricos**

Con el fin de demostrar que Mf es capaz de proteger las heridas en una superficie de la fruta, se sometió a ensayo su capacidad para colonizar y crecer en el sitio de la herida en una superficie de la fruta. La fruta se limpió con etanol al 95% y se practicaron heridas (heridas de 3x3 mm) utilizando una aguja de disección en cuatro sitios. Se pipeteó una alícuota (20 µl) de la suspensión de células de levadura (2×10^6 células/ml) en cada herida. La fruta se incubó a 20°C y a intervalos de 1 hora, 24 horas y 48 horas, se cortó una sección de 5 x 5 mm de cada una de las cuatro heridas y se agitó vigorosamente en 10 ml de agua destilada esterilizada durante 1 hora. Se prepararon diluciones seriadas al décimo del líquido de lavado y se sembraron 100 µl de cada dilución en NYDA. Se contó el número de colonias durante 48 horas de incubación a 25°C. Cada fruto que contenía cuatro heridas representaba una única repetición, y cada tratamiento contenía 6 repeticiones. Los datos (que se resumen en la Figura 2) se presentan como ufc (unidades formadoras de colonias) de *Metschnikowia fructicola* (Mf)/herida. Los resultados indican que Mf es capaz de replicarse y colonizar una herida en una superficie de la fruta a temperatura ambiente.

EJEMPLO 8

La colonización por *Metschnikowia fructicola* protege las heridas en la cáscara de los cítricos mediante la competencia por los nutrientes

Con el fin de establecer que mf es capaz de competir por los nutrientes, se practicaron heridas alrededor del extremo del tallo en pomelos esterilizados en superficie, con tres heridas por fruta. Cada herida se realizó insertando una aguja de disección a una profundidad de 3 mm. Se pipetearon en cada herida treinta µl de una suspensión acuosa de las células Mf antagonistas. Una a dos horas después, se aplicaron a cada herida 20 µl de una suspensión de esporas de *P. digitatum* (5×10^4 esporas/ml). Se preparó cáscara de pomelo macerada a partir de cáscara empapada en agua en los márgenes de las lesiones inducidas por *P. digitatum* en el pomelo. Se homogeneizaron diez gramos de la cáscara en un mezclador, se diluyeron con agua destilada hasta una potencia del 20% y a continuación se esterilizaron en autoclave. Se añadieron al macerado de cáscara alícuotas de suspensión concentrada de esporas de *P. digitatum* para dar una concentración final de esporas de 5×10^4 esporas/ml, que se utilizó para inocular las heridas de la fruta tratadas previamente con una suspensión de células de *Metschnikowia fructicola* (Mf). Se inocularon frutas testigo con una suspensión de esporas similar de *P. digitatum* en agua. Se inoculó cada fruta en tres sitios. Se utilizaron doce frutas para cada tratamiento para dar un total de 36 puntos de inoculación por tratamiento. El porcentaje de Infección por heridas se midió después de 5 días de incubación a 24°C. Los datos se resumen en la Figura 3. Los resultados indican que *Metschnikowia fructicola* (Mf) protege con éxito contra la infección del pomelo rojo por *Penicillium digitatum* (Pd), pero no lo hace en presencia de nutrientes complementarios extraídos de la cáscara. Estos resultados indican claramente que la competencia por los nutrientes juega un papel importante en la capacidad protectora de MF.

EJEMPLO 9

***Metschnikowia fructicola* protege contra la descomposición por moho verde de una forma dependiente de la concentración**

Con el fin de demostrar que el efecto protector de Mf es dependiente de la concentración, se practicaron heridas alrededor del extremo del tallo en pomelos esterilizados en superficie, como en el Ejemplo 8. Se pipetearon en cada herida treinta microlitros de una suspensión acuosa de las células Mf antagonistas. Una a dos horas después, se aplicaron a cada herida 20 µl de una suspensión de esporas de *P. digitatum* (5×10^4 esporas/ml). Se determinó el porcentaje de descomposición 1 semana después de la incubación en condiciones de humedad en bandejas de plástico a 24°C. Se utilizaron doce frutas por tratamiento. Los datos se resumen en la Figura 4. Los resultados indican que la inhibición completa de la descomposición se consiguió a una concentración de 10^8 ufc, consiguiéndose una protección parcial a concentraciones de 10^7 ufc y 10^6 ufc.

EJEMPLO 10

***Metschnikowia fructicola* no produce antibióticos**

Debido a que hay una gran preocupación por el uso generalizado de antibióticos, se examinó el mecanismo por el que Mf protege la fruta. Con el fin de determinar si la capacidad de Mf para proteger la fruta está mediada por la producción de antibióticos, se cribó Mf frente a tres patógenos principales de la fruta (*Aspergillus niger*, *Botrytis*

cinerea, *Penicillium digitatum*). Las células de levadura se sembraron en estrías en un lado de placas de PDA. se colocó un tapón de agar (0,5 x 0,5 mm) que contenía el cultivo fúngico en el otro lado de la placa y, a continuación se incubaron las placas a 25°C durante una semana. En la Figura 5 se presentan los resultados representativos. No se observó inhibición de los tres patógenos sometidos a ensayo. Esto demuestra que Mf no produce antibióticos difundibles.

EJEMPLO 11

La inhibición por *Metschnikowia fructicola* se correlaciona con la actividad quitinasa

Para someter a ensayo la eficacia relativa de control biológico de Mf y otras levaduras, se lavaron manzanas con agua del grifo, se secaron, se practicaron heridas uniformes de 4 mm de profundidad y 2 mm-3 mm de diámetro en un lado de cada fruta. Cada herida se inoculó con 40 µl de suspensión de levadura a una concentración de 10⁸ células/ml. Después de 3 horas, se añadieron a cada herida 20 µl de suspensión que contenía 10⁴ esporas/ml de *P. expansum*. Se almacenaron las manzanas tratadas a temperatura ambiente y a humedad relativa elevada. Se determinó el porcentaje de descomposición de las heridas 10 días después de la inoculación. Se determinó el número de heridas infectadas (descompuestas). Cada tratamiento consistió en 3 repeticiones de 10 frutas. Se practicaron heridas a cada fruta en un solo lugar.

Los resultados se resumen en la Figura 6. La detección de actividad quitinasa (recuadro) se realizó como sigue: se realizó un dodecil sulfato de sodio (SDS)-PAGE a pH 8,9 utilizando un gel de poliacrilamida al 15% (p/v) que contenía glicolquitina al 0,01% (p/v) como sustrato y SDS al 0,1% (p/v). La preparación de enzima bruta, obtenida del sobrenadante de los cultivos líquidos de levadura, se sometió a ebullición durante 2 minutos en sacarosa al 10% (p/v) y SDS al 2% en Tris-HCl 125 mM (pH 6,7). Se realizó la electroforesis a temperatura ambiente durante 1,5 horas a 20 mA. Después de la electroforesis, se incubó el gel durante toda la noche a 37°C en un aparato rotatorio en 200 ml de tampón de acetato de sodio 100 mM (pH 5). Al final del período de incubación, se tiñó el gel con blanco de calcoflúor M2R al 0,01% (p/v) en Tris-HCl 0,3 M (pH 8,9) durante 5 minutos, y se decoloró incubando el gel en 100 ml de agua destilada con una agitación suave durante 2 horas. Se visualizaron zonas de lisis colocando el gel bajo luz UV. Debido a que el blanco de calcoflúor M2R no tiñe la quitina hidrolizada, las bandas negras en la calle de Mf indican que la levadura Mf produce cantidades elevadas de quitinasa en comparación con las demás levaduras sometidas a ensayo. Los resultados presentados en la Figura 6 indican claramente que la capacidad superior de Mf para proteger las manzanas contra *Penicillium expansum* se correlaciona bien con la actividad quitinolítica. Otras levaduras que carecen de esta actividad (aislados #47 y #273) fueron menos eficaces contra *Penicillium expansum*. Estos datos indican que la actividad quitinolítica, así como la competencia, contribuyen al efecto protector de Mf.

EJEMPLO 12

Efecto de la temperatura sobre *Metschnikowia fructicola*

Se sometió a ensayo la capacidad de Mf de seguir siendo viable después de la exposición prolongada a temperaturas que oscilan entre 0°C y 42°C, en placas de agar de dextrosa de patata sólido. Se sembró suavemente en estrías Mf sobre la superficie de placas de PDA y se incubó a las temperaturas indicadas durante 4 días y a continuación se trasladó a 25°C durante 4 días más. El crecimiento se evaluó visualmente. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Crecimiento de la levadura *Metschnikowia fructicola* (Mf) a diferentes temperaturas

Incubación inicial de 4 días a la temperatura en °C	Tiempo de incubación (días) a 25°C después de la incubación inicial		
	4+	4	3
0		-	+++
5	+	+	+++
10	++	++	+++
20	+++	+++	+++
28	+++	+++	+++
37	-	-	+++
42-	-	-	-

Sin crecimiento: -
 Crecimiento débil: +
 Crecimiento moderado: ++
 Crecimiento normal: +++

Estos resultados indican que Mf permanece viable después del almacenamiento a 0°C-5°C y que Mf es capaz de soportar temperaturas inferiores a 37°C.

EJEMPLO 13***Metschnikowia fructicola* actúa sinérgicamente con fungicidas químicos**

5 Se desinfectaron en superficie uvas individuales (variedad Superior; uvas de mesa) por inmersión durante 1 minuto en hipoclorito de sodio al 1% (v/v) (pH 11,5) y se montaron en tiras de cinta adhesiva pegadas a almohadillas de PVC dentro de una caja de incubación. Las uvas se pincharon con una aguja hasta una profundidad de 2 mm y se pipetearon en el sitio de la herida 20 µl de una suspensión de células antagonistas (10^7 células/ml) o la marca Rovral de Iprodiona (5 ppm) o ambos y se dejaron secar durante 1-2 horas. A continuación se inocularon las uvas con 10 µl de suspensión de conidios de *B. cinerea* obtenidos de cultivos de patógenos de una semana de antigüedad incubados a temperatura ambiente. Se ajustó la concentración de esporas a $1-5 \times 10^4$ conidios/ml. Se aplicó cada tratamiento a tres repeticiones de 7-10 uvas. Después del tratamiento, se colocó papel de filtro húmedo en las cajas de incubación, que se cubrieron con polietileno para mantener una humedad relativa elevada. Se evaluó el porcentaje de uvas descompuestas en cada repetición después de 4-5 días a 20°C. Los resultados, resumidos en la Figura 7, indican que existe una sinergia significativa entre la marca Rovral de Iprodiona y Mf.

EJEMPLO 14***Metschnikowia fructicola* es compatible con una variedad de agroquímicos**

20 Con el fin de establecer que Mf es adecuada para combinarse con una variedad de plaguicidas químicos empleados comúnmente, se inoculó una potencia del diez por ciento de medio líquido (NYDB) con diversas concentraciones de productos agroquímicos comunes añadidos, con una suspensión de células de Mf (25 ml de 10^9 células/ml) y se incubó en un agitador rotatorio a temperatura ambiente. Se emplearon los siguientes productos agroquímicos disponibles en el mercado: TBZ (0,02%); Teldor (0,015%); Mitoz (0,025%); Rovral (0,02%); Switch (0,01%); e Imazalil (0,005%). Las muestras se retiraron asépticamente en el instante 0, a las 24 horas y a las 48 horas de incubación. Se realizaron diluciones seriadas de las muestras y se sembraron alícuotas de 30 µl de las diluciones en placas de PDA. Se incubaron las placas a 25°C durante 3-4 días y se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC).

30 Los resultados, resumidos en la Figura 8, indican que MF no se ve influida por los productos agroquímicos sometidos a ensayo, incluso los fungicidas, excepto Switch (0,01%) e Imazalil (0,005%) que ralentizaron, pero no evitaron, su crecimiento

EJEMPLO 15***Metschnikowia fructicola* sobrevive en condiciones de campo**

40 Con el fin de demostrar que Mf que es más adecuada para su uso en el campo que otras cepas de levadura, se recolectaron uvas de parcelas experimentales designadas para evaluar la eficacia de la levadura antagonista Mf sobre el control de las podredumbres precosecha y poscosecha de las uvas de mesa en la zona costera central de Israel (Truman). Se llevó a cabo la pulverización semanal de las levaduras (a partir del 21/6) a una concentración de 10^8 células/ml utilizando 231 (*Metschnikowia reukafii*), 414 (*Kluyveromyces thermotolerance*) y Mf. Se recogieron las uvas en la primera fecha de pulverización, después de que los racimos se hubieran secado y, posteriormente, antes de cada pulverización.

50 En cada recolección, se tomaron asépticamente muestras de cinco uvas por parcela en cubetas de plástico estéril de 150 ml que contenían 20 ml de agua y se agitaron en un agitador rotatorio a 200 rpm durante 1 hora. Después de realizar diluciones seriadas 1:10, se sembraron 20 µl de cada dilución en placas de Petri que contenían medio agar basal de levadura (BYA), que contenía 20 g de glucosa, 1 g de extracto de levadura, 10 g de proteasa peptona y 15 g de agar modificado con 250 mg de penicilina G (para suprimir el crecimiento de bacterias) en 1 litro de agua destilada. Se incubaron las placas de Petri a temperatura ambiente durante 3-4 días, después de lo cual se contó el número de colonias. La viabilidad de la levadura se expresa como UFC/baya. Los resultados, resumidos en la Figura 9, indican que *Metschnikowia fructicola* (Mf) sobrevive mejor en el campo que *Metschnikowia reukafii* (231) o *Kluyveromyces thermotolerance* (414) en las uvas de mesa (variedad Superior).

EJEMPLO 16***Metschnikowia fructicola* inhibe el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Botrytis cinerea* en las uvas**

60 Con el fin de demostrar que Mf es eficaz contra los patógenos importantes de la uva, se separaron uvas individuales de los racimos, se desinfectaron en superficie por inmersión durante 1 minuto en hipoclorito de sodio al 1% (v/v) (pH 11,5) y se montaron en tiras de cinta adhesiva como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Las uvas se pincharon con una aguja como se ha descrito anteriormente en el presente documento y se aplicó a la zona de la herida una suspensión de células antagonistas y se dejó secar como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Se utilizaron 30 µl de suspensión de células de cada cepa a una concentración de 10^8 células/ml. A

65

continuación se inocularon las uvas con 10 µl de suspensión de conidios de *Aspergillus niger* (Figura 10) o *Botrytis cinerea* (Figura 11). Las suspensiones de conidios preparadas y la concentración de esporas se ajustaron como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

- 5 Cada tratamiento se aplicó a tres repeticiones de 7-10 uvas. Después del tratamiento, se colocó papel de filtro húmedo en las cajas, que se cubrieron con polietileno para mantener una humedad relativa elevada. El porcentaje de uvas descompuestas en cada repetición se evaluó después de 4- 5 días a 20°C.
- 10 Las Figuras 10 y 11 indican claramente que Mf es la más eficaz de las cepas de levadura sometidas a ensayo en el control del crecimiento de *Aspergillus niger* y *Botrytis cinerea* en las heridas de uvas de mesa. En la Figura 11, el término A42 indica *Candida guilliemondii*, el número 495 indica *Debaryomyces hansenii* y las cepas 243 y 509 son levaduras no identificadas.

EJEMPLO 17

15 *Metschnikowia fructicola* controla la podredumbre de los racimos en las uvas

Con el fin de demostrar adicionalmente las cualidades superiores de Mf en el campo, se evaluó la eficacia de Mf comparada con un aerosol de fungicida químico (Mitos) contra la podredumbre de los racimos de uvas de mesa y de vinificación en diversas variedades en viñedos situados en las llanuras costeras del norte, centro y sur de Israel, en "Thompson Seedless" y "Superior Seedless" (uvas de mesa) y "Sauvignon blanc" (uvas de vinificación).

20 Las parcelas experimentales consistían en una a siete parras por tratamiento en los diferentes experimentos, dispuestas como bloques al azar con por lo menos cuatro repeticiones. Se aplicaron la levadura antagonista y los testigos químicos 4 veces por semana hasta el punto de goteo, con un pulverizador de mochila accionado manualmente. La incidencia de la descomposición en los experimentos con uva de vinificación y de mesa se determinó el día de la cosecha. Se tomaron muestras de cuarenta racimos de cada parcela y se clasificaron de acuerdo con el agente causal de la descomposición y el porcentaje de podredumbre. En los experimentos con uvas de mesa, la podredumbre se evaluó también en almacenamiento. Se recolectaron aproximadamente 3 kg-5 kg de uvas de cada parcela y se envasaron en bolsas de plástico que fueron envueltas en bolsas de polietileno para crear una humedad relativa elevada. Se evaluó el desarrollo de la podredumbre después de 3-4 semanas de almacenamiento a 0°C seguido de 4-7 días a 20°C.

25 Las Figuras 12 A y 12 B muestran claramente que la Mf aplicada a las uvas de vinificación a una concentración de 10^8 células/ml fue más eficaz que Mitos (0,25%) en el control de la podredumbre del racimo causada por *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Botrytis*.

30 Las Figuras 13 A y B 13 muestran claramente que la aplicación antes de la cosecha de la levadura MF a concentraciones tan bajas como 10^7 células/ml fue más eficaz que *M. reukaufii* o *K. thermotolerance* en el control de la podredumbre por *Rhizopus* desarrollada en los racimos de uvas en el campo.

35 La figura 14 muestra claramente que Mf aplicada a las uvas de mesa (variedad Superior) a concentraciones de 10^8 (Mf) y 10^7 (Mf¹) células/ml reducía la gravedad de la enfermedad después del almacenamiento en frío.

40 La Figura 15 muestra claramente que Mf aplicada a las uvas de mesa (variedad Thompson) a concentraciones de 10^8 y 10^7 células/ml antes de la cosecha era superior al tratamiento químico con una almohadilla saturada de SO₂ por caja de cartón en el control de la podredumbre del racimo causada por *Aspergillus* durante hasta 2 semanas de almacenamiento a 20°C.

45 La Figura 16 muestra claramente que Mf es más eficaz que *Metschnikowia reukaufii* (231), *Kluyveromyces thermotolerance* (414) o Mitos en el control de los daños en las uvas causados por los patógenos *Aspergillus* + *Botrytis* + *Rhizopus*.

50 En resumen, estos resultados indican que el uso de Mf como antagonista fúngico es tan eficaz como los fungicidas químicos comúnmente empleados para el control de la podredumbre precosecha y poscosecha de los racimo en las uvas.

EJEMPLO 18

60 *Metschnikowia fructicola* protege los bulbos florales frente a una variedad de patógenos

Se practicaron heridas en bulbos de lirio blanco en un solo sitio y se sumergieron durante 1 minuto en una suspensión de células de la levadura *Metschnikowia fructicola* (Mf), *Candida oleophila* o *Bacillus subtilis* a una concentración de 10^8 células/ml, se dejaron secar durante 2-3 horas y se inocularon con una suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* (10^5 esporas/ml; Figuras 17 A y B) o de *Penicillium hirsutum* (10^5 esporas/ml; Figuras 18 A y B) por pulverización de los bulbos hasta el punto de goteo. Como testigos se utilizaron bulbos pulverizados con

65

agua. Se determinó el porcentaje de bulbos infectados después de un período de almacenamiento de dos semanas a 9°C seguido de 1 semana de almacenamiento a 20°C.

Los datos resumidos en las Figuras 17 A y B muestran que Mf es más eficaz que *B. subtilis* en el control de la podredumbre por *Fusarium oxysporum* en los bulbos de lirio blanco. Los datos resumidos en las Figuras 18 A y B muestran que Mf es más eficaz que *C. oleophila* en el control de la podredumbre por *Penicillium hirsutum* en los bulbos de lirio blanco. En resumen, Mf ofrece una mayor protección para los bulbos de lirio que *C. oleophila* o *B. subtilis*.

EJEMPLO 19

***Metschnikowia fructicola* inhibe la infección natural de los frutos con hueso**

Con el fin de evaluar el efecto de las levaduras antagonistas *Metschnikowia fructicola* (Mf) y *Candida oleophila* sobre el desarrollo de la descomposición natural de un fruto con hueso, se emplearon nectarinas "Flavortop". Se sumergió la fruta en una suspensión de células (10^8 células.ml⁻¹) de Mf o de *Candida oleophila*. Como testigo negativo sirvió fruta sumergida en agua del grifo (20°C). La fruta tratada se almacenó a 0°C durante 30 días y a continuación se mantuvo durante 10 días a 24°C. Al final de esta segunda incubación, se determinó la incidencia de la descomposición. En todos los experimentos, cada tratamiento incluyó tres repeticiones de 30 frutas cada una.

Los resultados resumidos en la Figura 19 indican que Mf fue más eficaz que *Candida oleophila* en la prevención de la infección natural de nectarinas con *Alternaria spp.*, *Monilinia fructicola*, *R. stolonifer*, *B. cinerea* y *P. expansum*.

EJEMPLO 20

***Metschnikowia fructicola* inhibe la infección por *Penicillium* de las heridas de los frutos con hueso**

Se practicaron heridas en frutos con hueso (nectarinas "Flavortop" y melocotones "Swelling") con una aguja de disección (1 mm-2 mm de profundidad) y se aplicaron en cada herida 30 µl de la suspensión de células de levadura (10^8 células.ml⁻¹). Las levaduras antagonistas utilizadas fueron *C. oleophila* o *Metschnikowia fructicola* (Mf). La fruta tratada se dejó secar al aire y a continuación se inoculó con 20 µl de suspensión de esporas de *Penicillium expansum* (10^5 esporas.ml⁻¹) y se mantuvo en bandejas de plástico a 24°C en condiciones de humedad. El porcentaje de heridas infectadas se determinó 4 y 5 días después de la inoculación. Los resultados resumidos en la Figura 20 indican que *Metschnikowia fructicola* (Mf) fue más eficaz que *Candida oleophila* en la prevención de la colonización de heridas por *Penicillium expansum*.

EJEMPLO 21

La inhibición de *Metschnikowia fructicola* de la infección por *Penicillium* de los frutos con hueso es dependiente de la concentración

Se practicaron heridas en frutos con hueso (nectarinas "Flavortop" y melocotones "Swelling") como se ha descrito en el Ejemplo 20 y se aplicaron en cada herida 30 µl de diversas suspensiones de Mf (10^7 , 10^8 y 10^9 células/ml). La fruta tratada se manejó como en el ejemplo 20 anteriormente indicado en el presente documento. Los resultados, resumidos en la Figura 21, indican que la concentración de 10^9 células/ml de Mf fue completamente eficaz en la inhibición competitiva de la colonización de heridas por *Penicillium expansum* mientras que concentraciones menores proporcionaron grados de protección significativos.

EJEMPLO 22

***Metschnikowia fructicola* inhibe la infección por *Penicillium* de las frutas de pepita**

Se practicaron heridas en manzanas "Golden Delicious" con una aguja de disección (1 mm-2 mm de profundidad) y se aplicaron en cada herida 30 µl de diversas suspensiones de células de levadura Mf (10^8 y 10^9 células.ml⁻¹). Las frutas tratadas se dejaron secar al aire y se inocularon con 20 µl de suspensión de esporas de *Penicillium expansum* (10^5 esporas.ml⁻¹) y se almacenaron como en los ejemplos 20 y 21 anteriormente indicados en el presente documento. El porcentaje de heridas infectadas se determinó a los 5 días después de la inoculación.

Los resultados resumidos en la Figura 22 indican que en las frutas de pepita, al igual que en los frutos con hueso, la concentración de 10^9 células/ml de Mf fue completamente eficaz en la inhibición competitiva de la colonización de heridas por *Penicillium expansum* y que concentraciones menores proporcionaron grados de protección significativos.

EJEMPLO 23**La aplicación antes de la cosecha de *Metschnikowia fructicola* inhibe *Botrytis* en las fresas**

5 Con el fin de demostrar la utilidad de la aplicación antes de la cosecha de una levadura antagonista, se aplicó una suspensión de células de MF a una concentración de 10^8 células/ml, mediante una mochila de pulverización, a plantas de fresa en un campo comercial a intervalos semanales. La primera aplicación se dio en el momento de la floración. El tratamiento con levadura se comparó con diferentes fungicidas comerciales en las cantidades indicadas en la Fig. 23. Después de la cuarta aplicación, se contó en cada tratamiento el número de frutos descompuestos en el campo (Figura 23A). Además, se recogió la fruta, se almacenó a 1°C durante 3 días, seguido de 3 días a 24°C, para determinar el porcentaje de fruta descompuesta (Figura 23B). Estos resultados demuestran que la Mf aplicada en el campo proporciona protección frente a la podredumbre en el campo y durante el almacenamiento poscosecha. El tratamiento con Mf dio un nivel de protección comparable al de los plaguicidas comerciales.

EJEMPLO 24***Metschnikowia fructicola* inhibe el moho verde en los pomelos**

20 Con el fin de demostrar la versatilidad de Mf en la prevención de la descomposición poscosecha, se determinó la descomposición por moho verde en pomelos después de 6, 14, 18, 24 días de almacenamiento a 20°C. El experimento se realizó en una línea de envasado de cítricos a escala piloto que simulaba una operación comercial. A la entrada de la estación, la fruta recibió un lavado exhaustivo con agua corriente seguido de secado bajo ventiladores de aire caliente. A continuación se empapó la fruta con una suspensión de células de Mf, de *Metschnikowia raufafii* (231) o de *Candida oleophila* (182) (10^8 células/ml), se secó bajo ventiladores de aire caliente, se enceró y se envasó en cajas de cartón comerciales. La fruta se mantuvo a 20°C y se verificó después de diferentes períodos de incubación para detectar la existencia de descomposición.

30 Los resultados resumidos en la Figura 24 indican claramente que *Metschnikowia fructicola* (Mf) fue más eficaz que *Metschnikowia raufafii* (231) o *Candida oleophila* (182) en la prevención del desarrollo de descomposición por moho verde en los pomelos.

EJEMPLO 25***Metschnikowia fructicola* inhibe *Botrytis* en los tomates**

35 Con el fin de demostrar la utilidad de Mf en la protección de las hortalizas, así como de las frutas, se llevó a cabo un ensayo en tomates Cherry durante el almacenamiento. Los detalles del ensayo se dan en el Ejemplo 3. Los resultados, resumidos en la Figura 25, indican claramente que concentraciones de Mf tan bajas como 10^6 inhiben el desarrollo de *Botrytis cinerea* después de la infección artificial de los tomates Cherry.

EJEMPLO 26***Metschnikowia fructicola* inhibe *Botrytis* en las cerezas**

45 Con el fin de examinar la eficacia relativa de Mf en la protección de los frutos con hueso, se sometió a ensayo la capacidad de *C. oleophila* y MF para retardar el desarrollo de la descomposición poscosecha en las cerezas dulces. Se aplicó cada levadura antagonista a una concentración de 10^8 células/ml. Las cerezas se sumergieron durante 1 minuto en diversas soluciones salinas o suspensiones de células de levadura, se dejaron secar al aire y a continuación se almacenaron durante 30 días a 0°C, seguido de 4 días a 24°C. Los resultados, resumidos en la Figura 26, indican claramente que *Metschnikowia fructicola* (Mf) es superior a *C. oleophila* en el retardo del desarrollo de la descomposición natural por *Botrytis cinerea* en las cerezas dulces, en refrigeración y en almacenamiento posterior a temperatura ambiente.

EJEMPLO 27***Metschnikowia fructicola* inhibe *Botrytis* en los tomates en diversas condiciones de almacenamiento**

60 Con el fin de determinar la eficacia de Mf en la protección de los tomates Cherry en diversas condiciones de almacenamiento, se trataron tomates con levadura y se inocularon con *B. cinerea* como se ha descrito anteriormente en el presente documento (Ejemplo 3). Como testigo sirvieron tomates tratados con agua e inoculados con *B. cinerea*. Después del tratamiento, se dividieron los tomates en tres grupos. Un grupo se incubó a 5°C durante 14 días, el segundo grupo se incubó a 10°C durante 14 días y el tercer grupo se incubó a 20°C durante 5 días. Los resultados, resumidos en la Figura 27, indican claramente que MF proporciona una protección significativa en todas las condiciones sometidas a ensayo. Resulta especialmente impresionante la protección completa proporcionada a los tomates por Mf en refrigeración.

5 Aunque la invención se ha descrito junto con formas de realización específicas de la misma, es evidente que para los expertos en la materia se pondrán de manifiesto muchas alternativas, modificaciones y variaciones. Por consiguiente, se pretende abarcar todas estas alternativas, modificaciones y variaciones que pertenecen al amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REFERENCIAS

- 10 Chalutz, E., y Wilson, C.L., 1990, Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Dis.* 74:134-137.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C.L., y Wisniewski, M.E., 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Can. J. Microbiol.* 35: 794-800.
- 15 Droby, S., Wilson, C.L., Wisniewski, M., y El-Ghaouth, A. 2001. Biologically based technology for the control of postharvest diseases of fruits and vegetables. En: *Microbial Food Contamination*, C.L. Wilson and S. Droby (eds.). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Gullino, M.L., Aloï, C., Palitto, M., Benzi, D., y Garibaldi, A., 1991, Attempts at biocontrol of postharvest diseases of apple. *Med. Fac: Landbouw. Rijksuiv. Gent*, 56: 195.
- 20 Janisiewicz, W. y Roitman, J., 1988, Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathol.* 78:1697-1700.
- Janisiewicz, W.J., Peterson, D.L., y Bors, R., 1994, Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. *Plant Disease* 78:466-470.
- Droby, S., Chalutz, E., y Wilson, C.L., 1991, Antagonistic microorganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Postharvest News and Information* 2: 169-173.
- 25 Lurie, S., Droby, S., Chalupowicz, L., y Chalutz, E., 1995, Efficacy of *Candida oleophila* strain 182 in preventing *Penicillium expansum* infection of nectarine fruits. *Phytoparasitica* 23:231-234.
- Roberts, R.G., 1990, Biological control of mucor rot of pear by *Cryptococcus laurentii*, *C. flavus*, and *C. albidus*. *Phytopathol.* 80: 10⁵¹.
- Chand-Goyal, T., y Spots, R. A. 1996. Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with low doses of thiabendazole. *Postharv. Biol. Technol.* 7:51-64.
- 30 Ippolito, A., El Ghaouth, A., Wilson, C. L., y Wisniewski, M. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharv. Biol. Technol.* 19:265-272.
- El Ghaouth, A., Wilson, C. L., Wisniewski, M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspect of the biocontrol activity of *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathol* 88: 282-291.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cultivo biológicamente puro de una levadura de la especie *Metschnikowia fructicola* identificada como NRRL Y-30752, siendo capaz dicho cultivo de inhibir competitivamente el crecimiento de un microorganismo nocivo en una parte de una planta a la que se aplica una cantidad biológicamente eficaz del cultivo.
2. Cepa biológicamente pura de *Metschnikowia fructicola* que posee todas las características identificativas del cultivo biológicamente puro según la reivindicación 1.
- 10 3. Mutante biológicamente puro de *Metschnikowia fructicola*, que posee todas las características identificativas del cultivo biológicamente puro según la reivindicación 1.
- 15 4. Levadura de la especie *Metschnikowia fructicola* según la reivindicación 1, en la que dicho microorganismo nocivo está seleccionado del grupo que consiste en *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium spp.* y *Molinilia spp.*
- 20 5. Levadura de la especie *Metschnikowia fructicola* según la reivindicación 1, en la que dicha parte de una planta está seleccionada del grupo que consiste en un fruto con hueso, una fruta de pepita, un cítrico, una uva, una baya, una hortaliza y una hierba.
- 25 6. Composición para su uso en la protección de productos agrícolas que comprende, como ingrediente activo, una cantidad biológicamente eficaz de levadura de *Metschnikowia fructicola* biológicamente pura que posee todas las características identificativas del cultivo biológicamente puro según la reivindicación 1, conteniendo adicionalmente dicha composición un vehículo.
- 30 7. Composición según la reivindicación 6, en la que dicha levadura se suministra en un estado fisiológico seleccionado del grupo que consiste en activo o latente; o en la que dicha levadura se suministra en una forma física seleccionada de entre una suspensión líquida, una emulsión, un polvo, gránulos, un liofilizado y un gel; o en la que dicha composición comprende adicionalmente un antibiótico químico.
- 35 8. Composición según la reivindicación 7, en la que dicho antibiótico químico está seleccionado del grupo que consiste en un fungicida, un agente antimicrobiano y un plaguicida.
- 40 9. Composición según la reivindicación 8, en la que dicho fungicida incluye por lo menos un producto químico seleccionado del grupo que consiste en Iprodiona, Tiabendazol, Imazalil (1-(2-2,4-Diclorofenil)-2(2-propenilo-xi-etil)-1H-imidazol), Fenhexamida, Pirimetamil y una combinación de Fludioxonil y Ciprodinil.
- 45 10. Método de inhibición del crecimiento de un microorganismo nocivo en una parte de una planta, comprendiendo el método aplicar por lo menos una vez una cantidad agrícola eficaz de cultivo biológicamente puro de una levadura de la especie *Metschnikowia fructicola*, identificada como NRRL Y-30752, a la parte de una planta.
- 50 11. Método según la reivindicación 10, en el que dicha levadura comprende una cepa de la *Metschnikowia fructicola* según la reivindicación 10 que posee todas las características identificativas de la misma; o en el que dicha levadura de la especie *Metschnikowia fructicola* comprende un mutante de *Metschnikowia fructicola* que posee todas las características identificativas de la misma; o en el que la parte de una planta está seleccionada del grupo que consiste en una fruta de pepita, un fruto con hueso, un cítrico, una variedad de uva, una hortaliza y un bulbo floral; o en el que dicho microorganismo nocivo está seleccionado del grupo que consiste en *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* y *Rhizopus stolonifer*.
- 55 12. Artículo de fabricación que comprende material de envasado y una composición identificada para su uso en la protección de productos agrícolas frente a un microorganismo nocivo que comprende, como ingrediente activo, una cantidad biológicamente eficaz de levadura biológicamente pura de la especie *Metschnikowia fructicola* que posee todas las características identificativas del cultivo biológicamente puro según la reivindicación 1, conteniendo adicionalmente dicha composición un vehículo.
- 60 13. Artículo de fabricación según la reivindicación 12, que comprende adicionalmente un aplicador diseñado y construido para aplicar dicha levadura al producto agrícola.
14. Artículo de fabricación según la reivindicación 12, en el que el producto agrícola está seleccionado del grupo que consiste en una fruta de pepita, un fruto con hueso, un cítrico, una variedad de uva, un bulbo floral y una hortaliza; o en el que dicho microorganismo nocivo está seleccionado del grupo que consiste en *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Geotrichum candidum* y *Rhizopus stolonifer*, o

en el que la levadura biológicamente pura de la especie *Metschnikowia fructicola* se identifica como NRRL Y-30752;
o
en el que la levadura biológicamente pura de la especie *Metschnikowia fructicola* es un mutante que posee todas las características identificativas del cultivo biológicamente puro según la reivindicación 1.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

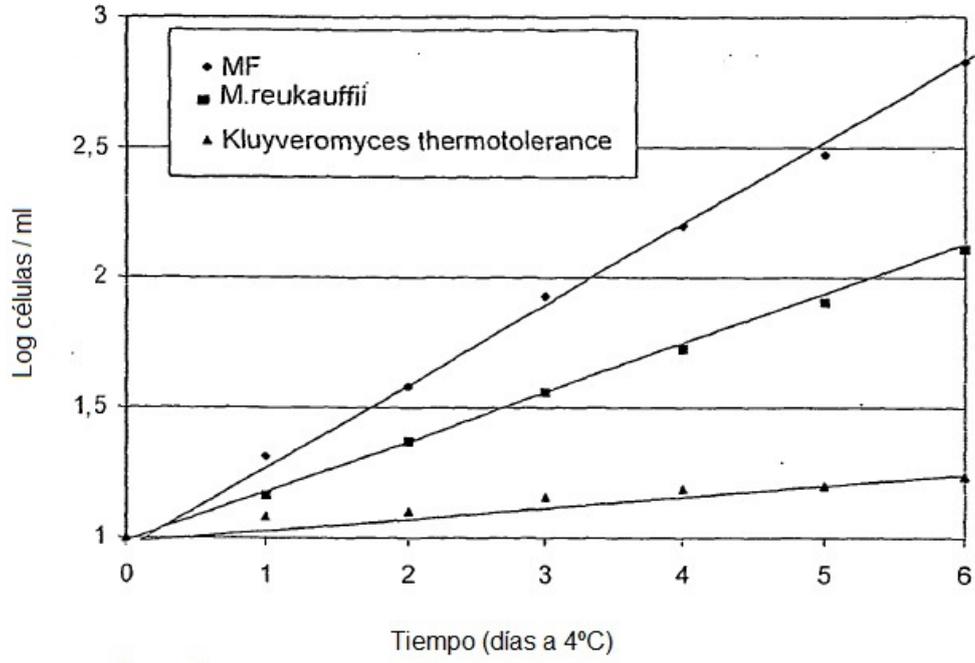


Figura 1

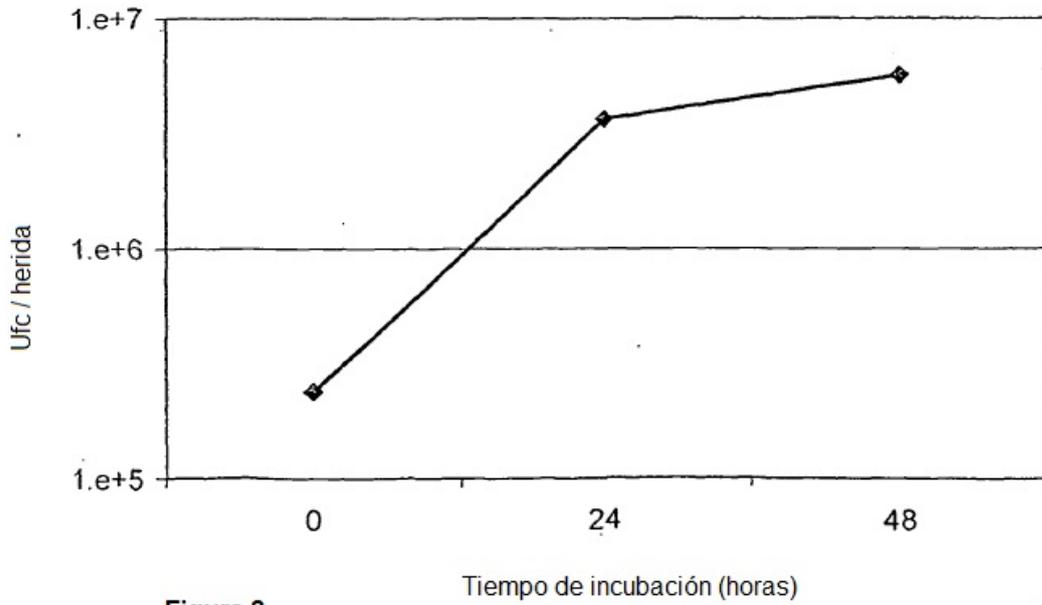


Figura 2

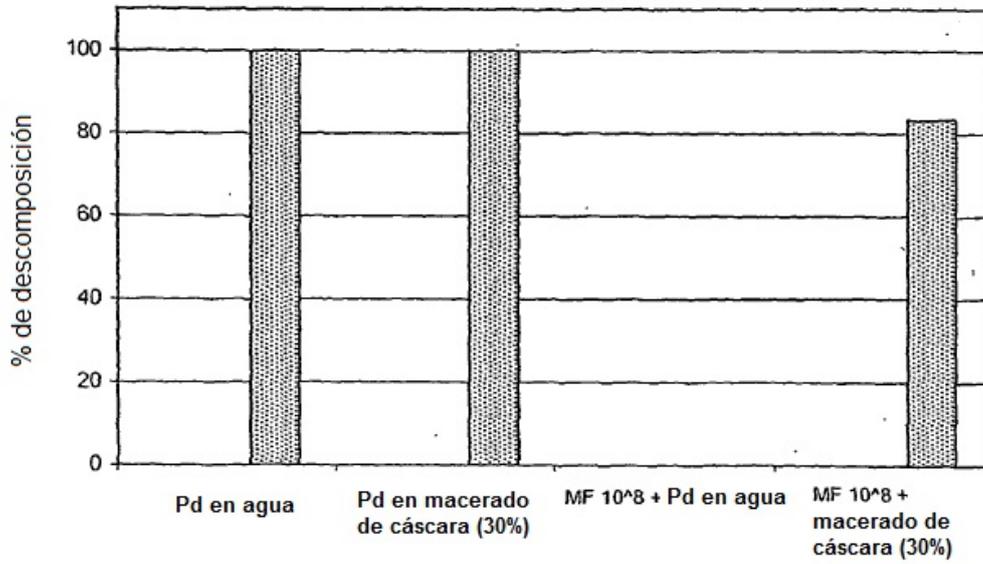


Figura 3

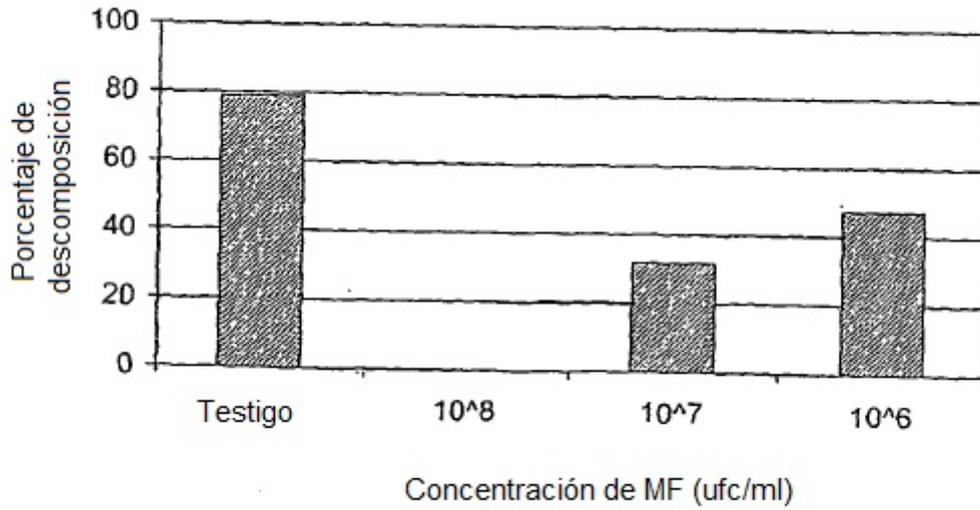
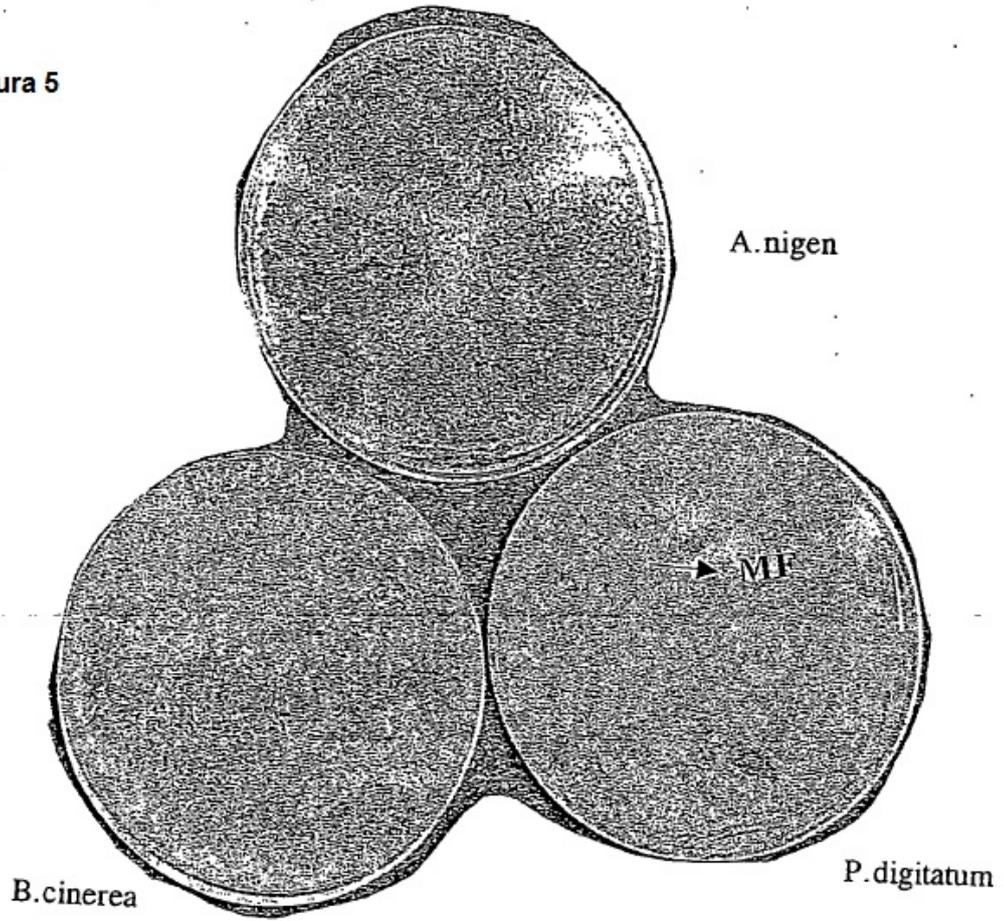


Figura 4

Figura 5



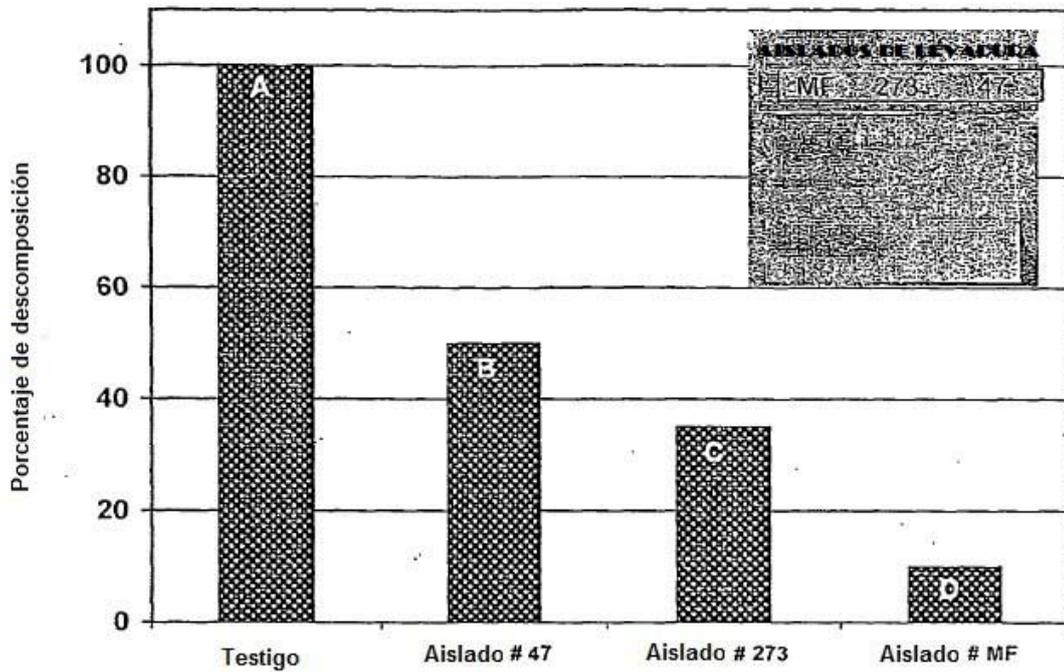


Figura 6

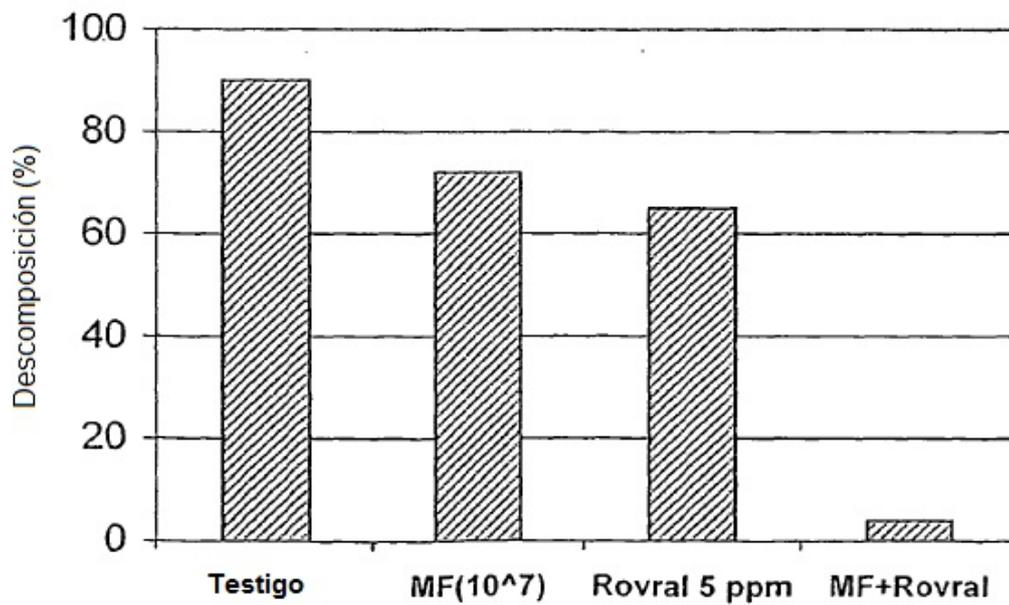


Figura 7

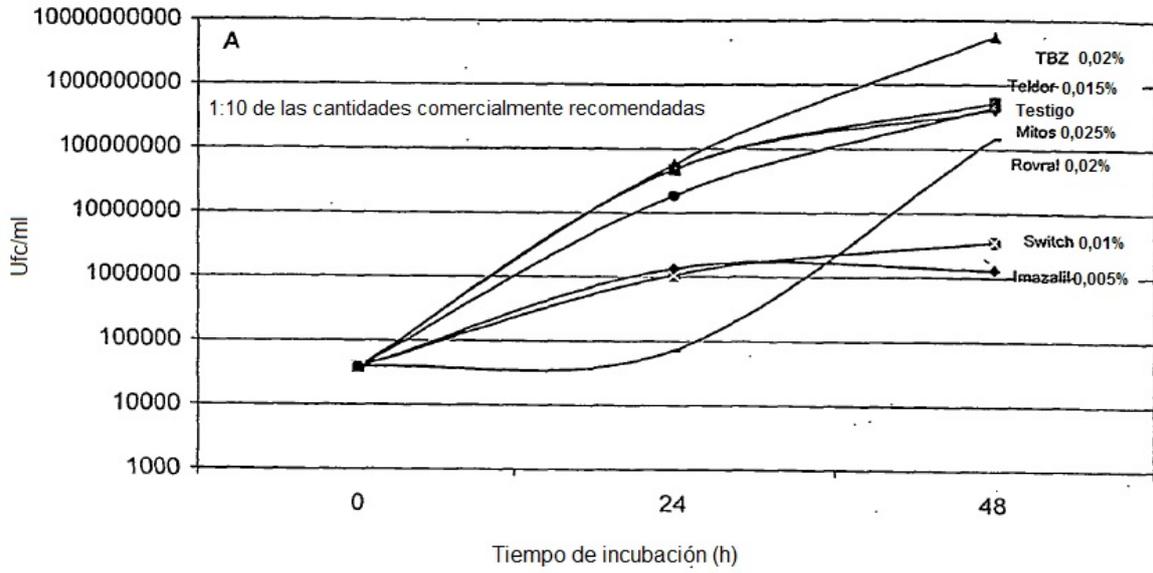


Figura 8

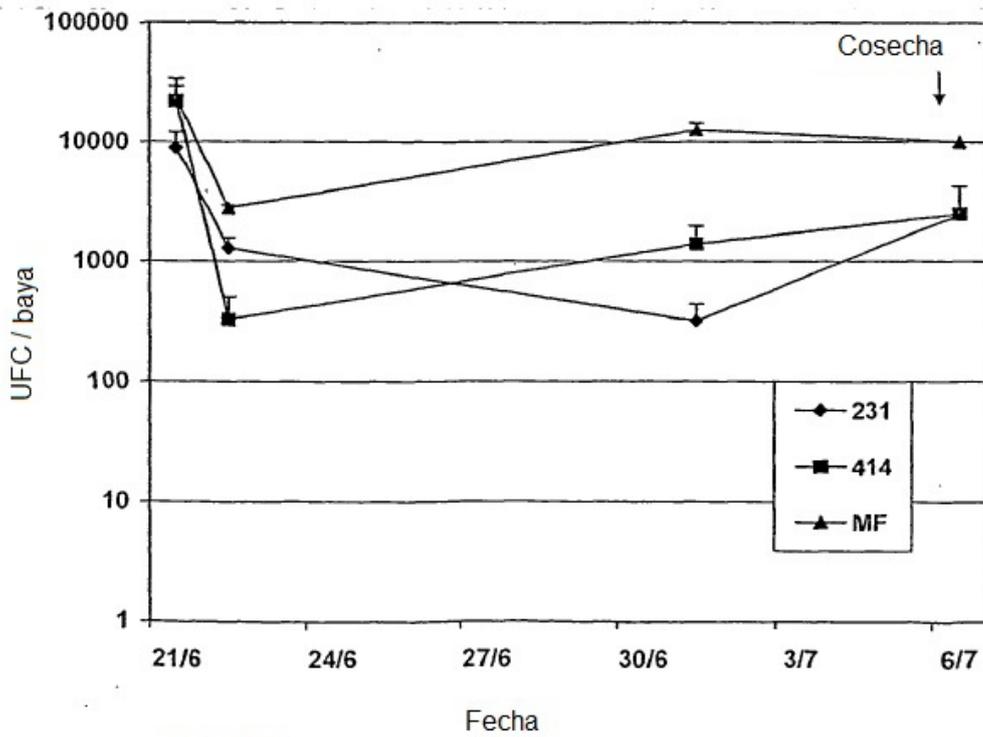


Figura 9

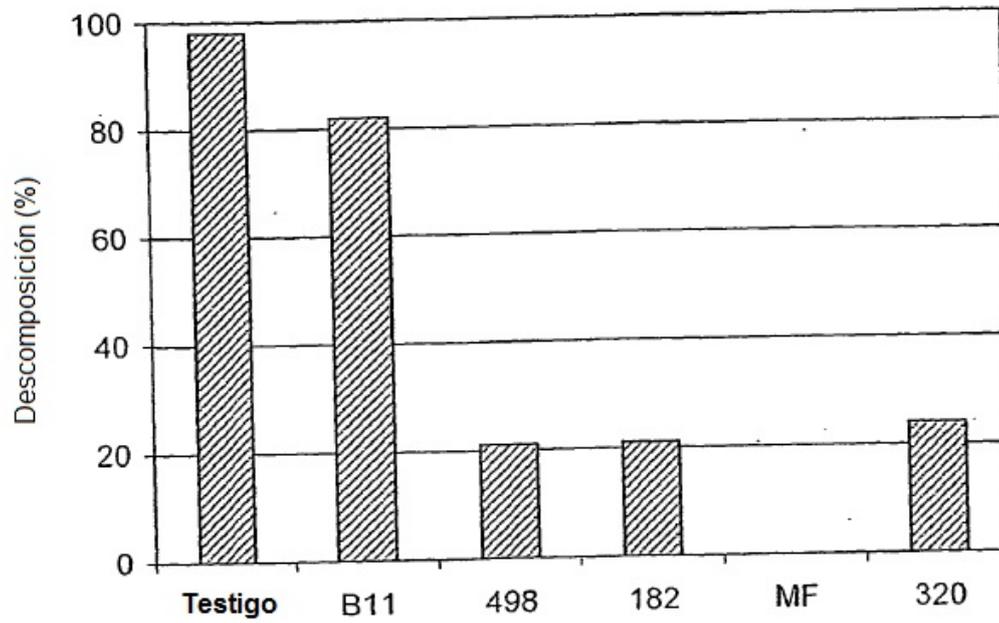


Figura 10

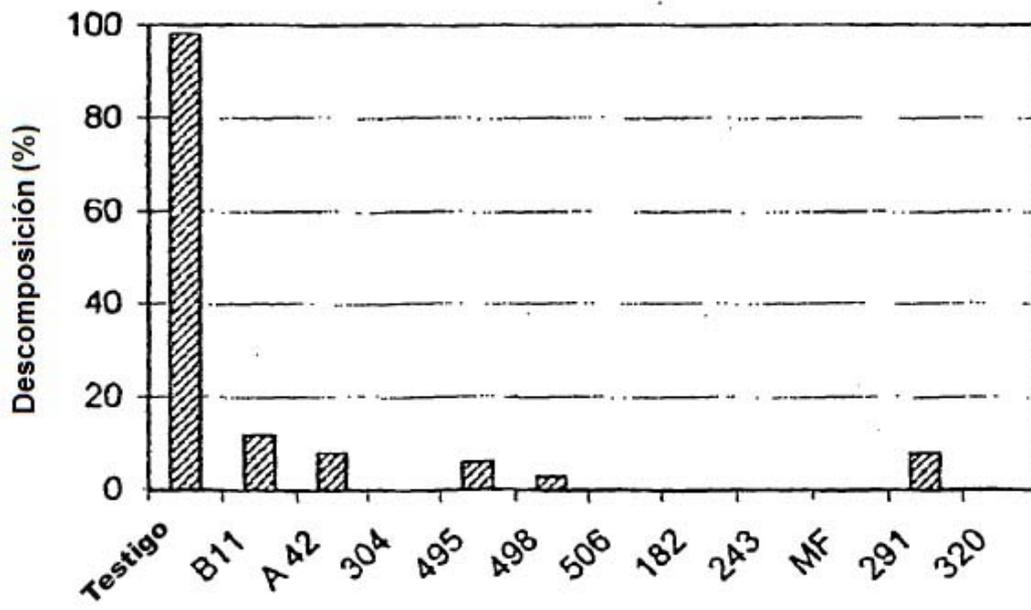


Figura 11

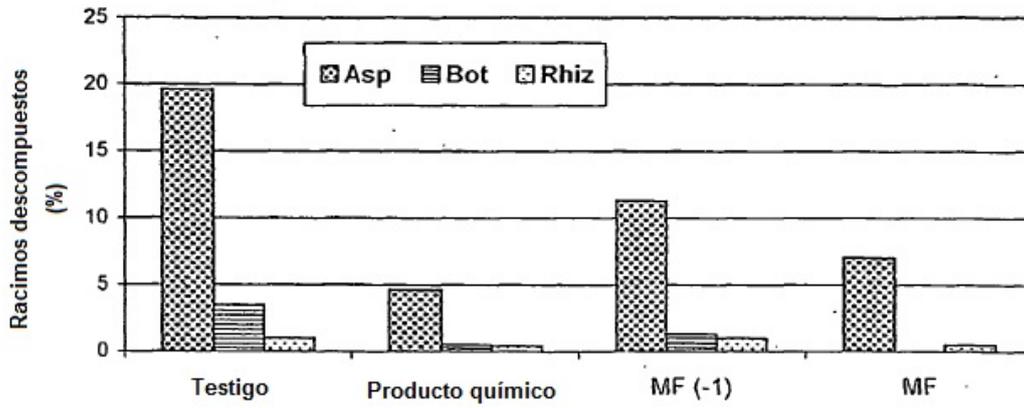


Figura 12A

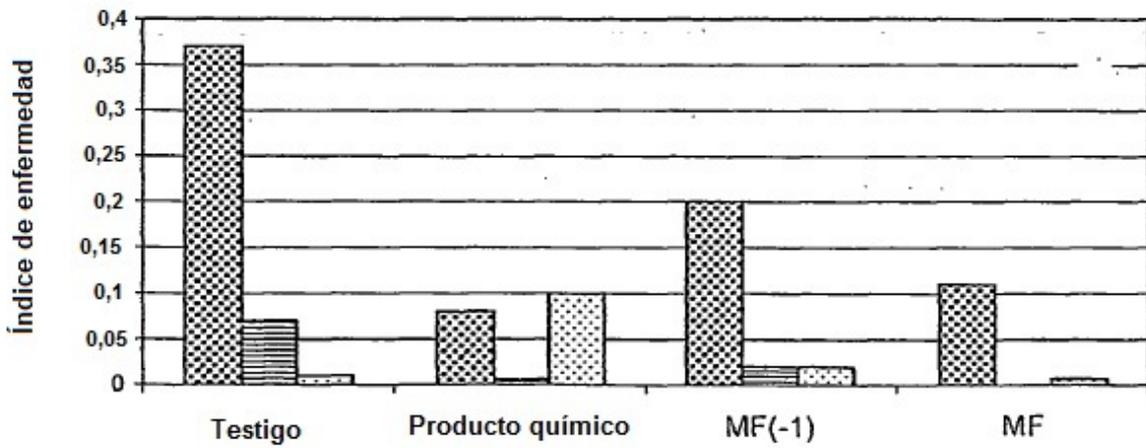
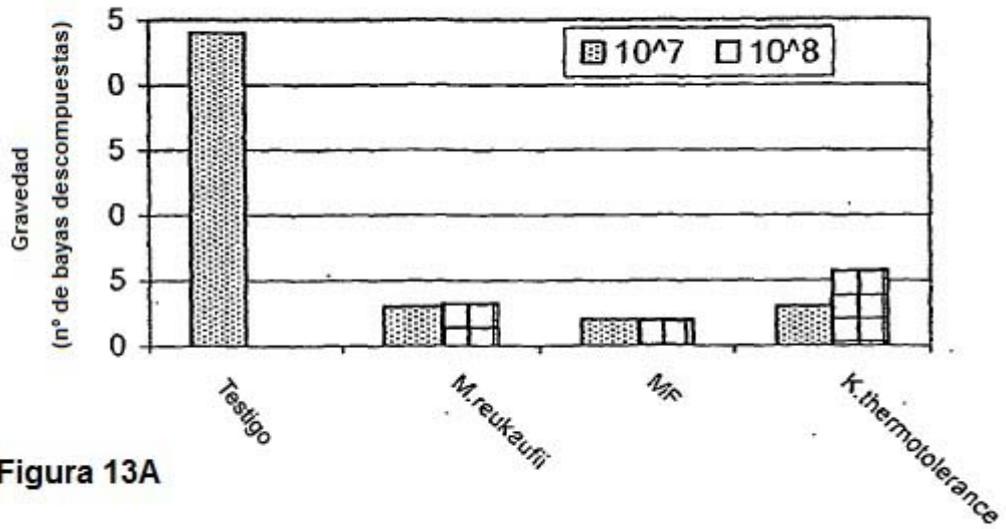


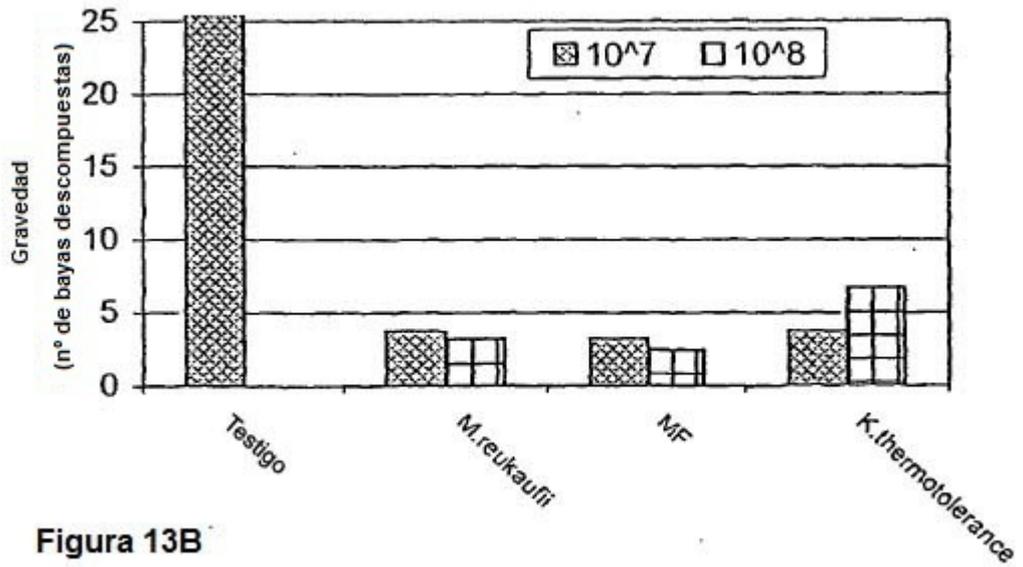
Figura 12B

Vino de uva / campo
 (-1) = dilución 1/10

Rhizopus



Descomposición total



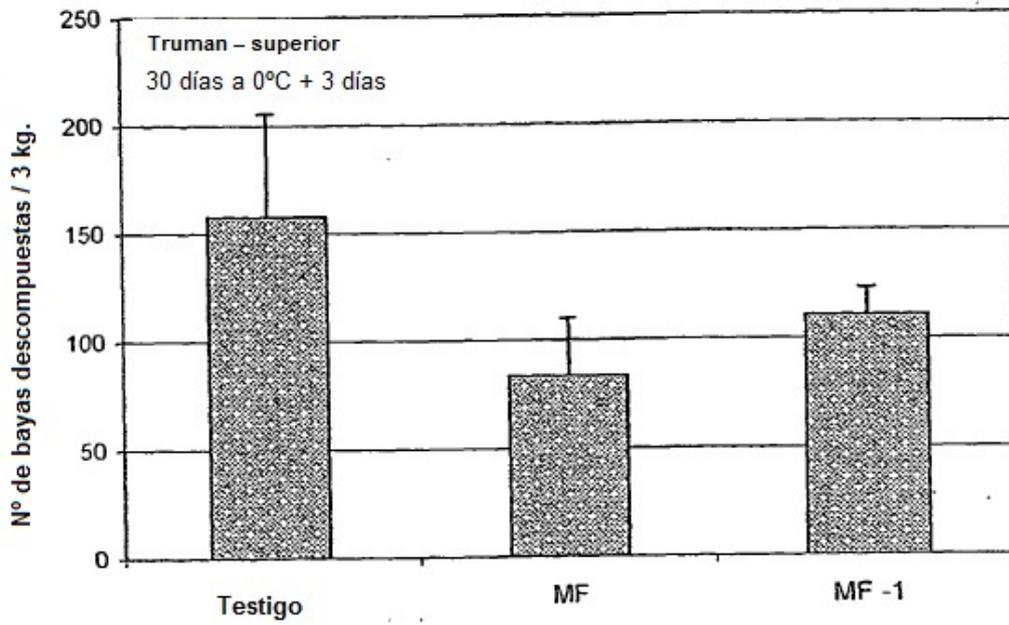


Figura 14

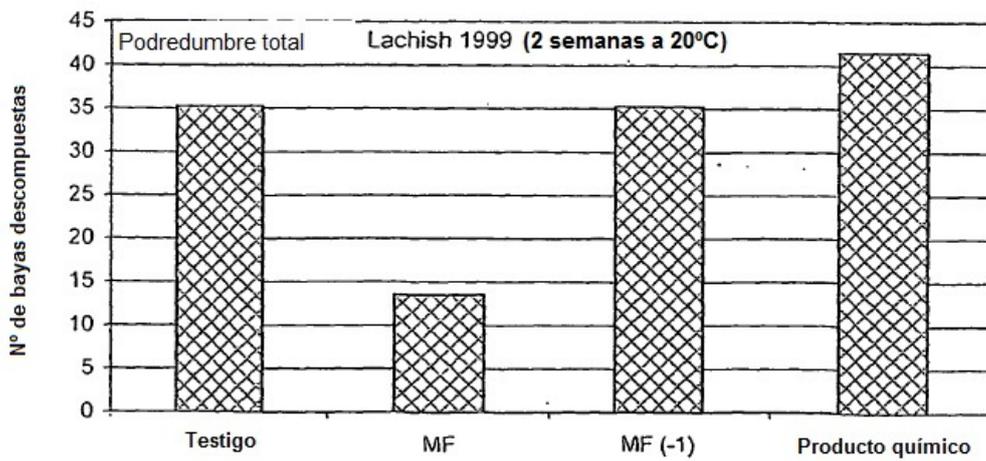
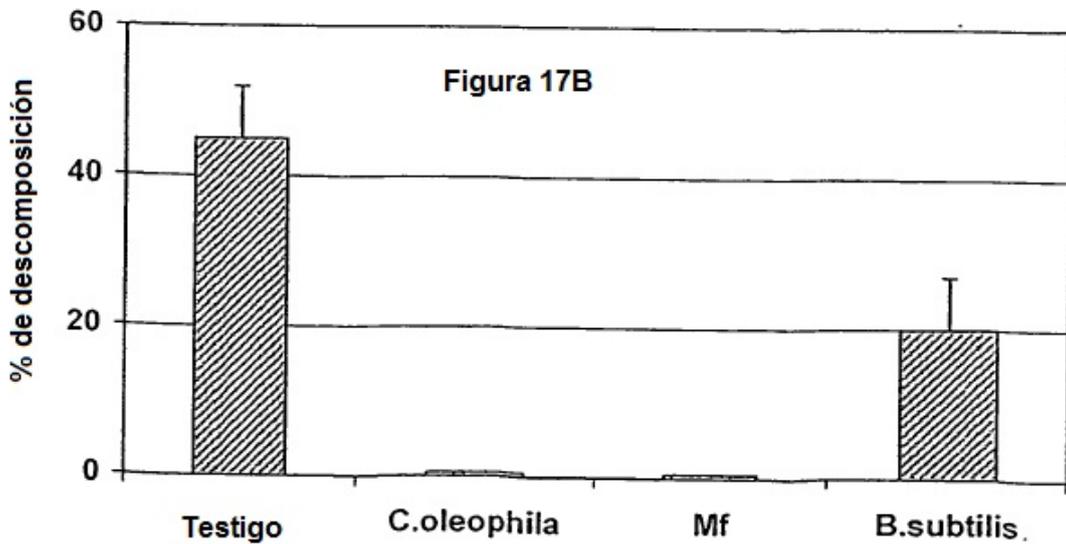
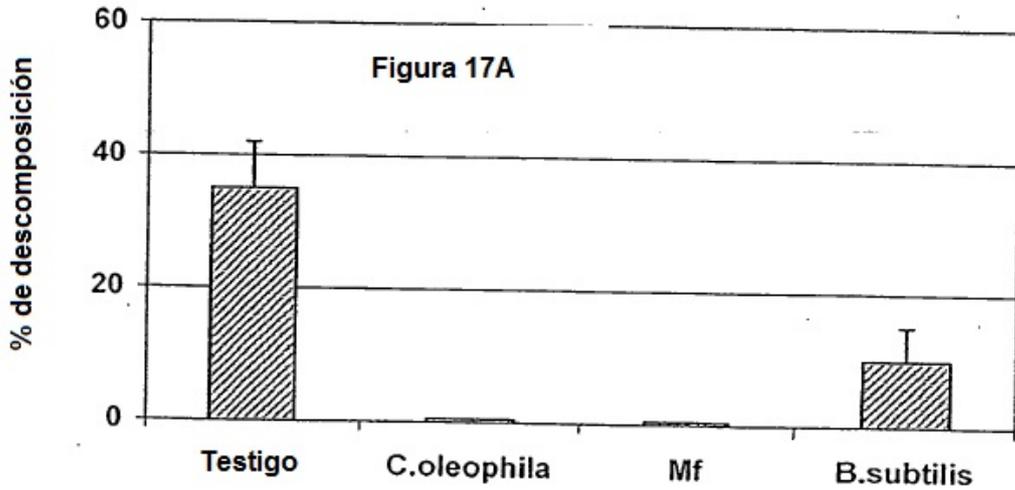
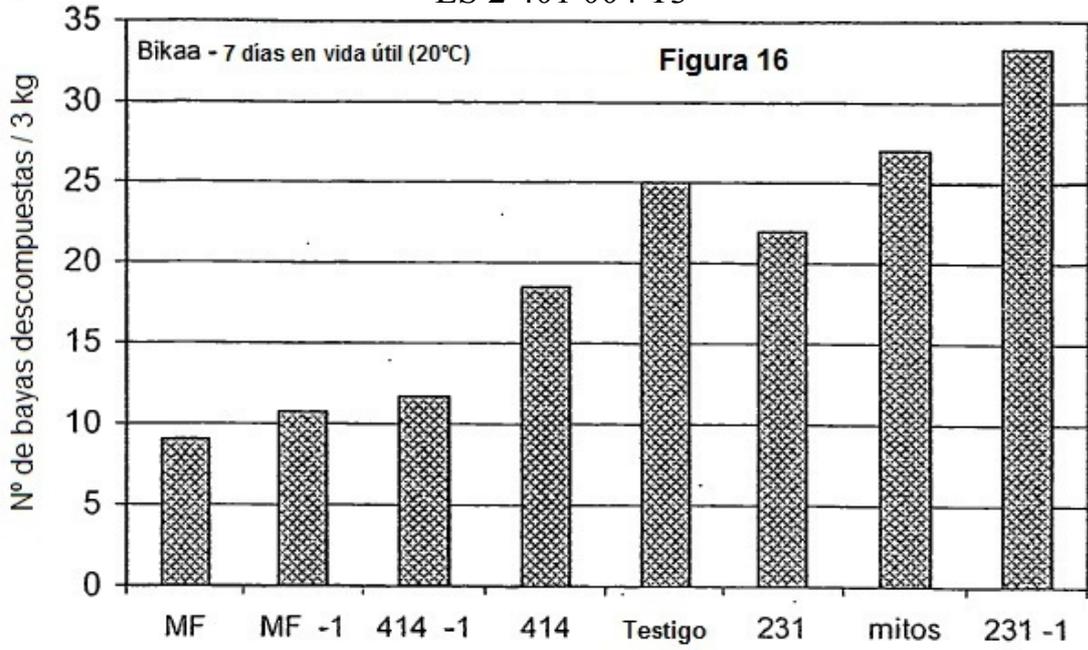
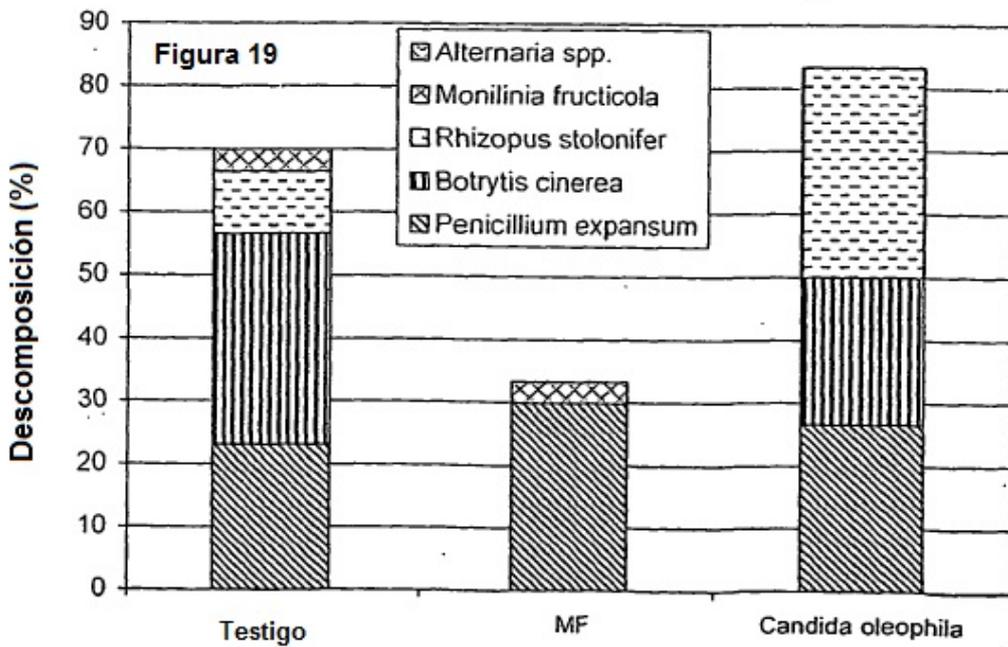
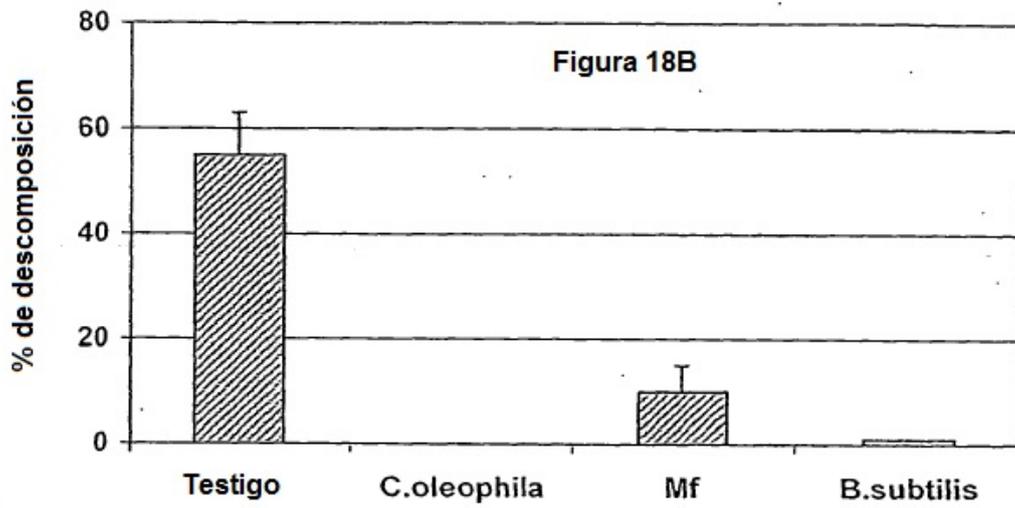
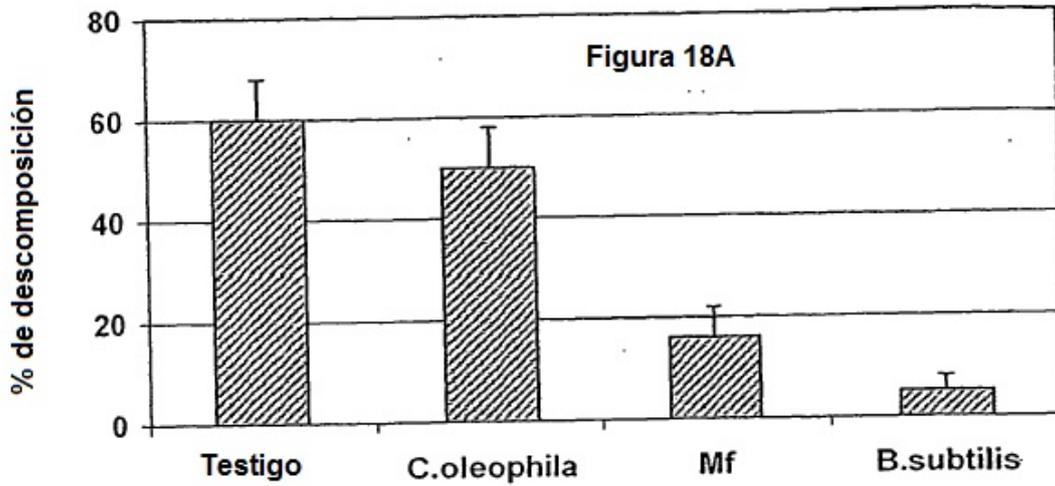


Figura 15





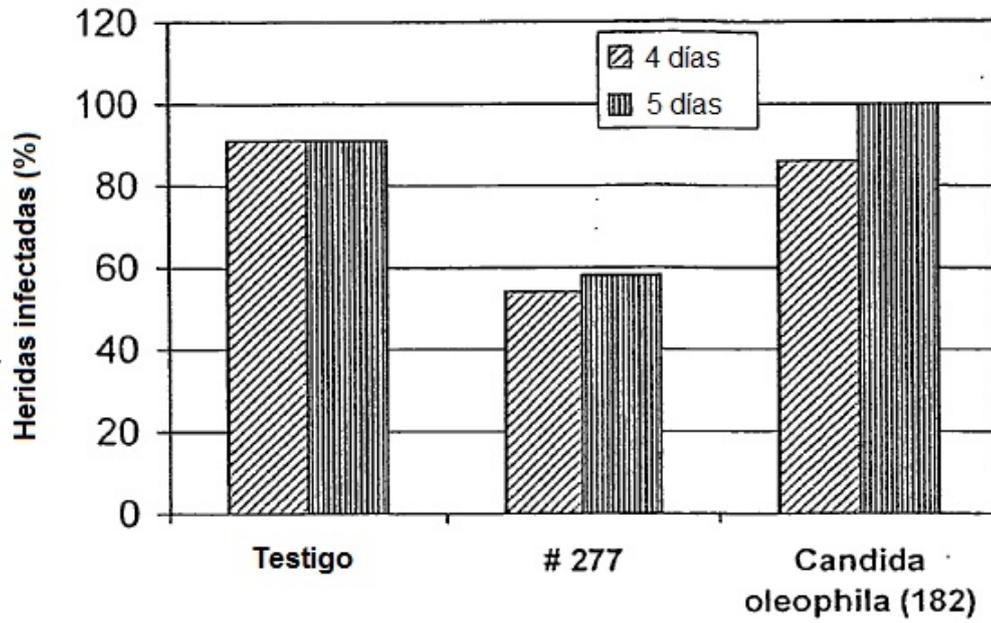


Figura 20

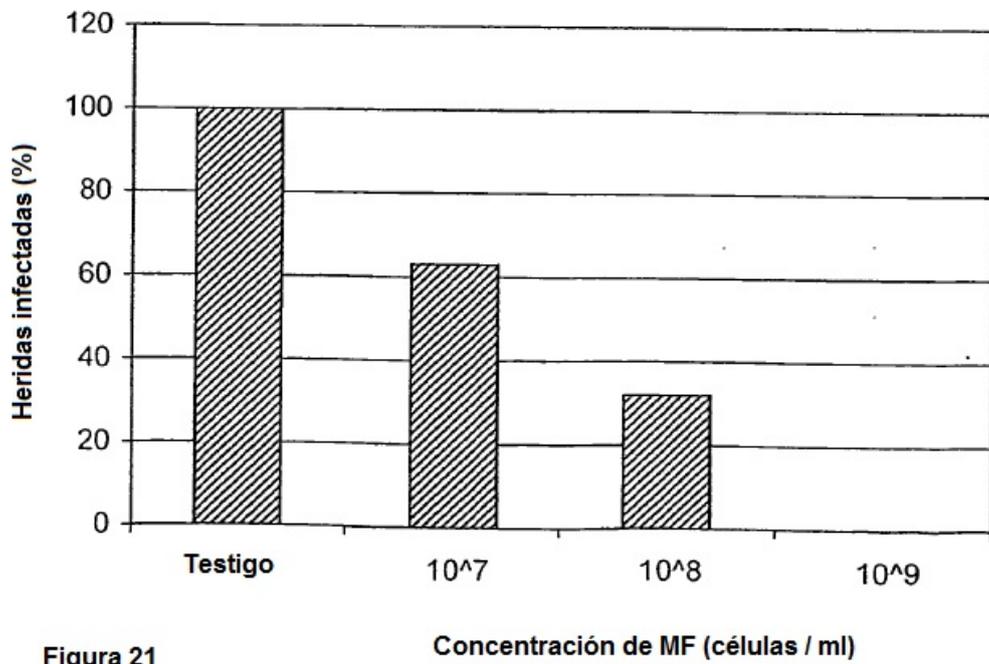


Figura 21

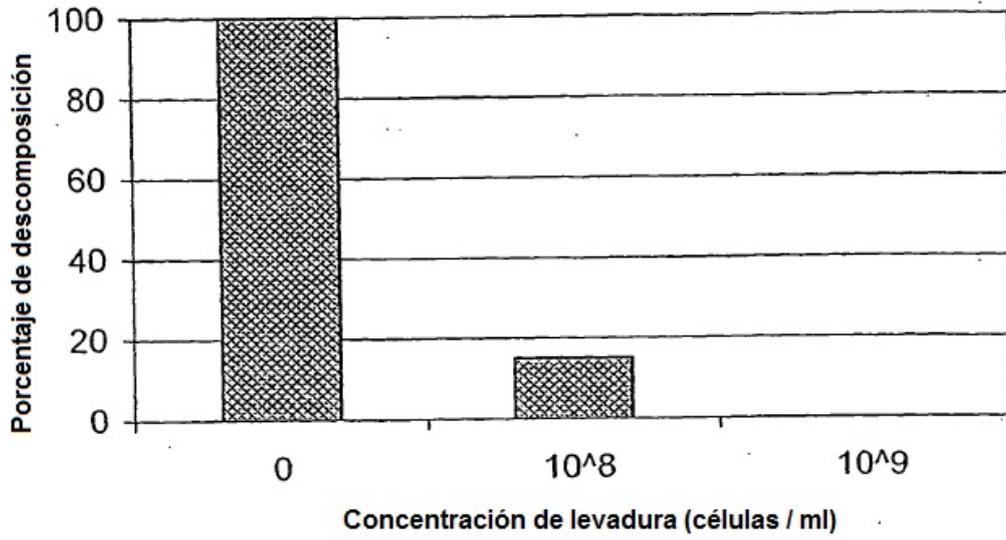


Figura 22

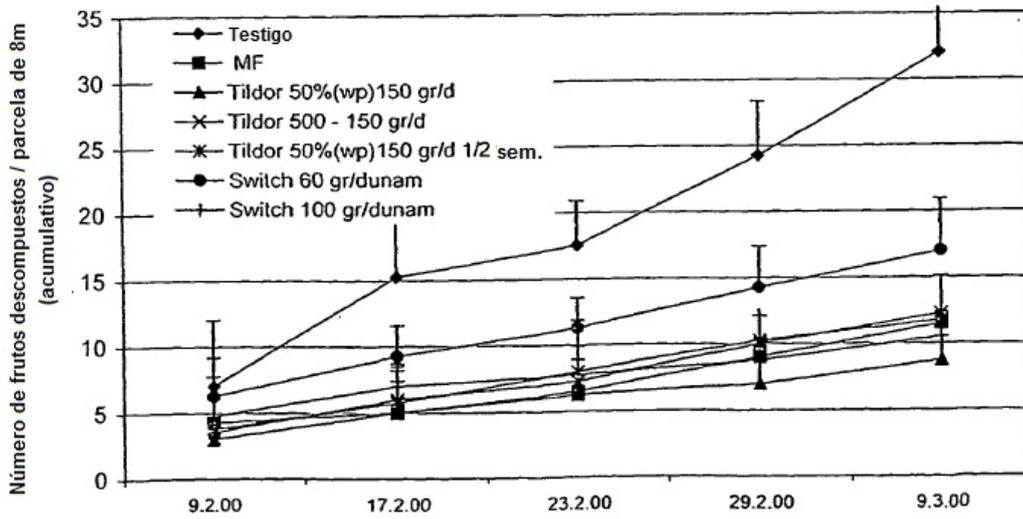


Figura 23A

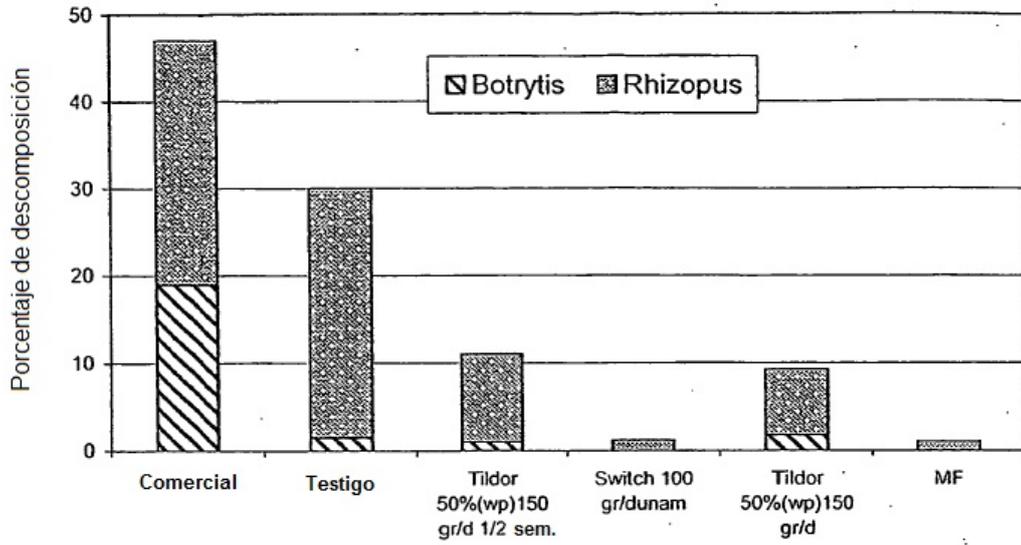


Figura 23B

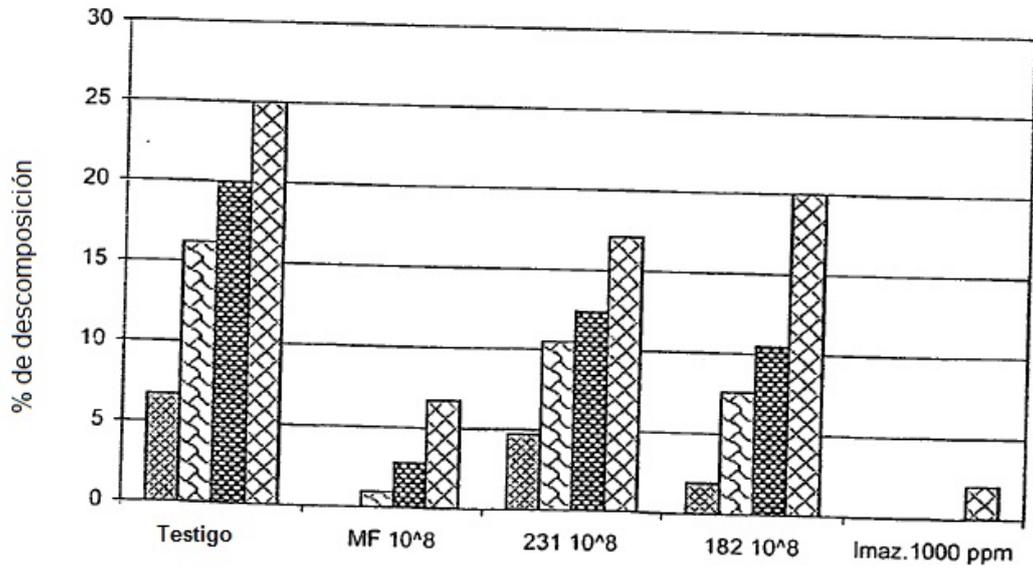


Figura 24

Días a 20°C

6 14 18 22

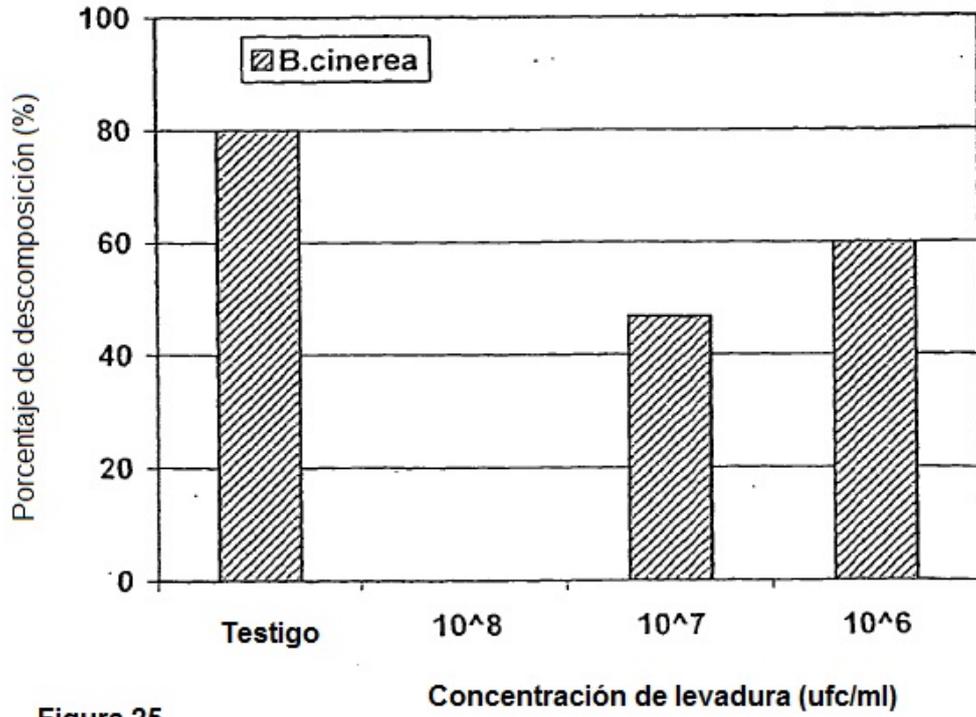


Figura 25

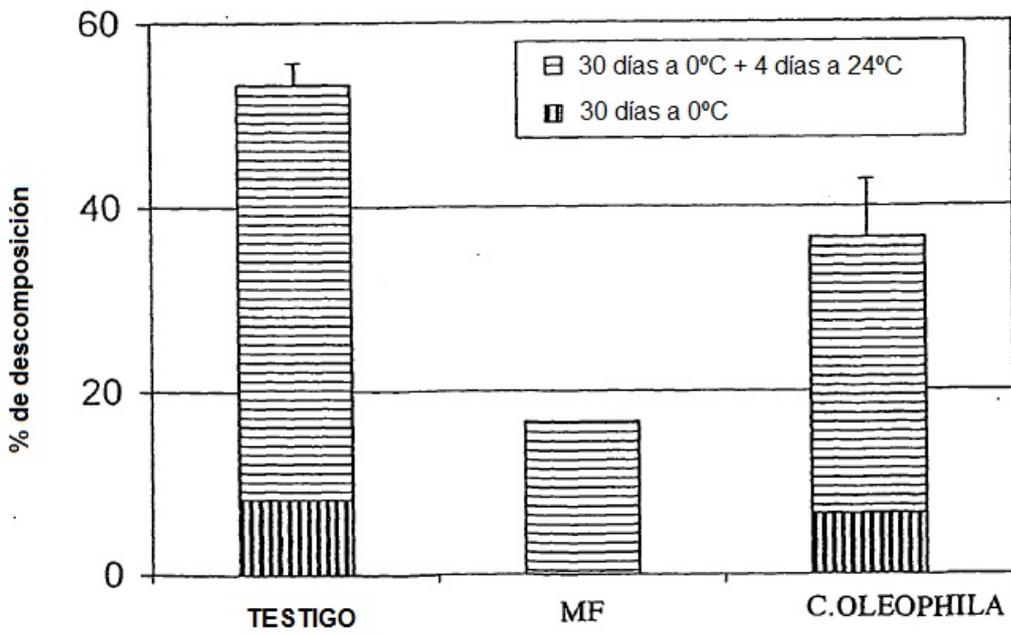


Figura 26

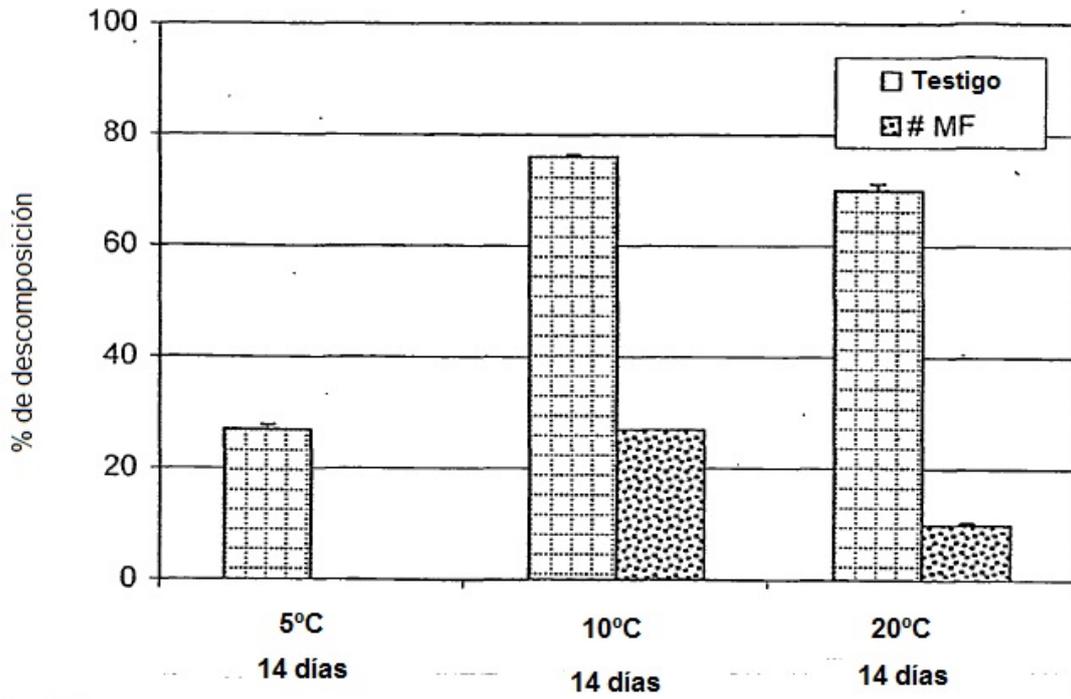


Figura 27