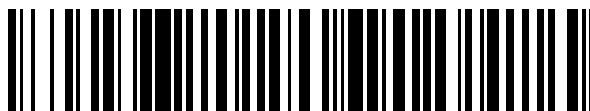


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 591**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2011** **E 11715934 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014** **EP 2545158**

54 Título: **Tratamiento de las plantas contra la infección por oomicetos**

30 Prioridad:

11.03.2010 FR 1051767

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

13.11.2014

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (100.0%)
147, Rue de l'Université
75338 Paris Cedex 07, FR**

72 Inventor/es:

**GALIANA, ERIC;
PONCHET, MICHEL y
MARAIS, ANTOINE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 521 591 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

Tratamiento de las plantas contra la infección por oomicetos

La invención hace referencia a un microorganismo útil para el tratamiento de las plantas contra la infección ocasionada por los oomicetos fitopatógenos. La invención tiene por objetivo utilizar otras fuentes de tratamiento
5 diferentes a los utilizados habitualmente, tales como el tratamiento químico o el tratamiento genético.

Los oomicetos representan un filo de protistas filamentosos que comprenden aproximadamente 500 especies. Son organismos acuáticos no fotosintéticos que, aunque se parecen a los hongos, no están emparentados con ellos. Los estudios moleculares recientes han permitido clasificarlos mejor en el grupo taxonómico *Stramenopila*. Se caracterizan por existir en algún momento de su ciclo vital una célula biflagelada.

10 Los oomicetos viven en el agua, sobre desperdicios orgánicos y cadáveres de animales pequeños. Algunas especies viven en el suelo como saprófitos sobre desechos orgánicos. La mayoría de las especies son patógenos importantes de las plantas. Entre los oomicetos fitopatógenos se conoce el género *Pythium*, que comprende numerosas especies de parásitos de plantas y algunos otros parásitos de animales. El género *Phytophthora* es igualmente responsable de enfermedades de las plantas silvestres y cultivadas. *Plasmopara viticola* es el agente del
15 mildiú de la vid.

Por ejemplo, la especie *Phytophthora parasitica* (*P. parasitica*) ocasiona una enfermedad que afecta a las plantas, en particular a las plantas cultivadas tales como el tomate, el pimiento, la berenjena, los cítricos, el cacao, el tabaco. Más en concreto, la especie *P. parasitica* es responsable de la aparición del síndrome de la «pata prieta» en el tabaco.

20 Las enfermedades vegetales provocadas por la infección de los oomicetos se manifiestan mediante síntomas heterogéneos, foliares o radiculares (podredumbre, pie negro, enanismo, manchas oscuras, y luego marchitez general de la hoja, de una rama o de toda la planta). Los oomicetos se encuentran con frecuencia asociados a la rizosfera y se pueden transmitir por el suelo.

Así pues, entre los oomicetos, muchos de ellos son microorganismos fitopatógenos, que constituyen una restricción importante para la agricultura mundial y el medio al ocasionar pérdidas considerables en todo el mundo (del 10 al 60% según los cultivos) y en particular debido a *Phytophthora parasitica*, *sojae* y *ramorum*, *Plasmopara halstedii* y *viticola*.

Para limitar el impacto de las enfermedades provocadas por los oomicetos se suelen utilizar fungicidas, en particular el metalaxilo, pero también tratamientos a base de cobre, fungicidas de contacto (manebo, mancocebo, fluazinam...),
30 fungicidas penetrantes (cimoxanilo), fungicidas que difunden (dimetomorf, propamocarb) o fungicidas sistémicos (oxadixilo). El número de sustancias activas disponibles es, no obstante, reducido; además, no sólo aparecen riesgos por las resistencias de los oomicetos, sino que estos productos pueden ser perjudiciales en potencia para el medio ambiente.

Otra alternativa consiste en la creación de variedades vegetales resistentes a las enfermedades, sobre la base de un cribado de los recursos genéticos disponibles según los procedimientos clásicos o mediante biotecnología, como se expone, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. US2008 022423.

Pero, al igual que ocurre con los productos químicos, los oomicetos tienen la capacidad de eludir las resistencias varietales; además, el tiempo de desarrollo de una variedad resistente a partir de estos programas de mejora genética resulta bastante largo.

40 También se conocen tratamientos que hacen intervenir los microorganismos como agentes de lucha biológica contra diversos hongos fitopatógenos; por ejemplo las solicitudes de patente internacional WO95/20879, WO95/31106, WO03/065811, KR2003/0075092, WO2010/009241 muestran, respectivamente, la utilización de metabolitos producidos por *Trichoderma*, de una cepa de *Fusarium*, de las cepas de *Bacillus cereus* y *subtilis*, de una cepa de *Paenibacillus*, de una combinación de *Trichoderma* y *Bacillus amyloliquefasciens*, para luchar en concreto contra
45 *Phytophthora*.

Sin embargo, los profesionales disponen todavía de pocos procedimientos de control biológico de los oomicetos a pesar del interés renovado por estos procedimientos alternativos. Los inventores han buscado en este contexto una solución alternativa a los tratamientos químicos sin los inconvenientes de otros procedimientos que se citan a continuación.

50 Mediante un procedimiento completamente original de identificación de microorganismos capaces de cohabitar en el seno de una biopelícula con al menos una especie dada de oomiceto fitopatógeno, los inventores han aislado una cepa de microorganismo particular cuyo efecto es impedir el desarrollo de una infección por dicha especie de oomiceto fitopatógeno. Más en concreto, los inventores han descubierto que esta cepa de microorganismo permitía

controlar el crecimiento de dicho oomiceto fitopatógeno. El control del crecimiento se efectúa mediante la inhibición, al menos parcial, del crecimiento del oomiceto fitopatógeno. De hecho, los inventores se han interesado por la flora microbiana presente en la rizosfera de una planta. En la superficie de una planta hospedadora, el oomiceto forma una biopelícula a la que se le asocian otros microorganismos que proceden en especial de la rizosfera. Por

- 5 biopelícula se entiende una película formada por una agrupación de oomicetos, en donde dichos oomicetos generan una matriz protectora y adhesiva compuesta por sustancias poliméricas y por sustancias denominadas quimiotácticas que van a atraer a los diversos microorganismos que proceden de la rizosfera.

Los microorganismos que aparecen asociados en las biopelículas se han ido seleccionado con el tiempo por su capacidad para cohabitar con el oomiceto fitopatógeno. Así se han seleccionado probablemente microorganismos

- 10 capaces de desarrollarse utilizando como único recurso nutritivo el aportado por el oomiceto fitopatógeno; entre estos mismos microorganismos, algunos son finalmente capaces de inhibir, al menos parcialmente, el crecimiento del oomiceto al cual están asociados.

Al mezclar los microorganismos de la rizosfera con el oomiceto fitopatógeno, los inventores han aislado y caracterizado una nueva cepa de microorganismo que inhibe el desarrollo del oomiceto.

- 15 En un ejemplo de realización de la invención, el oomiceto fitopatógeno es *Phytophthora parasitica* (*P. parasitica*). Pero se podría tratar de otra especie de oomiceto fitopatógeno.

Así pues, la invención tiene por objeto una cepa de hongo filamentoso del género *Phoma* depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur el 25 de febrero de 2010 con el n.º CNM I-4278.

- 20 Un análisis molecular ha permitido establecer que esta cepa comprende un ARN ribosómico 18S o ARNr 18S codificado por un gen de secuencia nucleotídica SEQ ID n.º 1. Esta secuencia de nucleótidos SEQ ID n.º 1 presenta un 98% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos que codifica el ARNr 18S de *Phoma herbarum*.

Además, la cepa de *Phoma* anteriormente identificada presenta las características siguientes:

- inhibe al menos parcialmente el crecimiento de oomicetos fitopatógenos,
- inhibe el crecimiento de oomicetos del género *Phytophthora*,
- 25 – inhibe el crecimiento de *Phytophthora parasitica*.

En el mismo ejemplo de realización de la invención, los inventores han descubierto que un sobrenadante de cultivo de la cepa *Phoma* de acuerdo con la invención inhibe el crecimiento de *P. parasitica*. Pero se entiende que este sobrenadante podría igualmente inhibir al menos parcialmente el crecimiento de otras especies de oomicetos.

- 30 Así pues, la invención tiene por objeto un sobrenadante de cultivo de la cepa anteriormente descrita, en donde dicho sobrenadante de cultivo inhibe al menos parcialmente el crecimiento de oomicetos fitopatógenos.

Además, la invención presenta las características siguientes:

- el sobrenadante comprende al menos un metabolito cuyo tamaño es inferior o igual a un valor comprendido entre 0,18 µm y 0,22 µm, preferiblemente inferior o igual a 0,2 µm.
- el sobrenadante de cultivo inhibe el crecimiento de *Phytophthora parasitica*.
- 35 Asimismo, la invención tiene por objeto un procedimiento de obtención del sobrenadante anteriormente mencionado, en donde dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:
 - poner a cultivar la cepa anteriormente descrita,
 - poner en suspensión el cultivo obtenido, caracterizado por comprender la etapa siguiente
 - filtrar la suspensión a través de una trama de 0,18 µm a 0,22 µm, preferiblemente de 0,2 µm,
 - 40 – recuperar la solución filtrada.

Como variante, antes de la filtración de la suspensión, el procedimiento de obtención prevé centrifugar la suspensión entre 1500 g y 6000 g durante 1 a 10 minutos, preferiblemente a 2000 g durante 2 minutos.

Asimismo, la invención tiene por objeto otro procedimiento de obtención del sobrenadante anteriormente mencionado, que comprende las etapas siguientes:

- 45 – poner a cultivar la cepa anteriormente descrita,

- poner en suspensión el cultivo obtenido, caracterizado por comprender la etapa siguiente
- centrifugar la suspensión entre 1500 g y 6000 g durante 1 a 10 minutos, preferiblemente a 2000 g durante 2 minutos, y luego
- recuperar el sobrenadante.

5 La cepa anteriormente descrita se puede utilizar para la fabricación de una composición fitosanitaria destinada a tratar plantas contra la infección por oomicetos. Por composición fitosanitaria se entiende una composición que comprende como sustancia activa los aditivos aceptables en la agricultura, además la cepa *Phoma* y/o un sobrenadante de cultivo.

10 En el mismo ejemplo de la invención no limitante, la especie *P. parasitica* es una de las especies de oomicetos contra la cual es activa la cepa. Pero se podría tratar de otra especie de *Phytophthora* o de otra especie de oomiceto.

Por lo tanto, la invención también tiene por objeto una composición fitosanitaria, caracterizada por comprender la cepa de *Phoma* anteriormente descrita.

15 El sobrenadante de cultivo de la cepa de *Phoma* depositada e identificada a continuación también se puede utilizar para la fabricación de una composición fitosanitaria destinada a tratar los vegetales contra la infección por oomicetos fitopatógenos.

Así pues, la invención tiene también por objeto una composición fitosanitaria, caracterizada por comprender un sobrenadante de cultivo como el anteriormente descrito.

20 En concreto, las plantas susceptibles al tratamiento pueden ser una planta de tabaco, tomate, patata, pimiento, vid, girasol, árboles frutales u otro tipo de planta susceptible de ser infectada por las especies de oomicetos fitopatógenos.

La invención tiene también por objeto una composición fitosanitaria, caracterizada por comprender la cepa de *Phoma* anteriormente descrita.

La invención tiene también por objeto una composición fitosanitaria, caracterizada por comprender un sobrenadante de cultivo como el anteriormente descrito.

25 La invención tiene también por objeto una composición fitosanitaria, caracterizada por comprender la cepa de *Phoma* anteriormente descrita y el sobrenadante de cultivo como el anteriormente descrito.

La invención también tiene por objeto la utilización de la cepa de *Phoma* anteriormente descrita para la fabricación de una composición fitosanitaria destinada a tratar las plantas contra la infección de los oomicetos fitopatógenos.

30 La invención también tiene por objeto la utilización del sobrenadante de cultivo anteriormente descrito para la fabricación de una composición fitosanitaria destinada a tratar las plantas contra la infección de los oomicetos fitopatógenos.

Finalmente, la invención tiene por objeto la utilización de la cepa de *Phoma* anteriormente descrita y del sobrenadante de cultivo anteriormente descrito para la fabricación de una composición fitosanitaria destinada a tratar las plantas contra la infección por oomicetos fitopatógenos.

35 La invención se entenderá mejor con la lectura de la descripción que sigue y el examen de las figuras que la acompañan. Éstas se presentan sólo a título indicativo y de ninguna manera limitan la invención. Las figuras muestran lo siguiente:

Figura 1: una representación esquemática de una formación de una comunidad de microorganismos recogidos de una rizosfera de una planta y de una microcolonia de *P. parasitica*;

40 Figura 2: una representación esquemática de una formación de una biopelícula a partir de una colonia de *P. parasitica*;

Figura 3: una representación esquemática de un procedimiento de selección de microorganismos capaces de vivir en presencia de *P. parasitica*;

45 Figura 4: representaciones esquemáticas de una coinfección *in vitro* y en la planta de *P. parasitica* y de los microorganismos capaces de vivir en presencia de *P. parasitica*;

Figura 5A: una fotografía al microscopio óptico de un medio de cultivo que comprende solamente un filtrado que comprende agua y la especie *P. parasitica*;

Figura 5B: una fotografía al microscopio óptico de un medio de cultivo que comprende *P. parasitica* y un sobrenadante de cultivo de microorganismos que procede del aislado I3 seleccionado por que los propios microorganismos que proceden del aislado I3 tienen la capacidad de sobrevivir en presencia de *P. parasitica*;

- Figura 6: una fotografía de una hoja de tabaco que se ha puesto en contacto con zoosporas de *P. parasitica* solas (Pp) o en contacto con zoosporas de *P. parasitica* mezcladas con esporas que proceden de diferentes microorganismos (I1: *Penicillium*; I2: *Aspergillus* y I3: cepa de *Phoma*), y

Figura 7: una representación gráfica del porcentaje del efecto de un sobrenadante de cultivo de microorganismos sobre la germinación de zoosporas de *P. parasitica* (I3) y del efecto de otro filtrado que contiene agua sobre el crecimiento de *Phytophthora parasitica* (C), en donde dichos microorganismos proceden de un aislado I3 seleccionado por que los microorganismos contenidos en este aislado son capaces de sobrevivir en presencia de *P. parasitica*.

1 – Material y métodos

1.1. Constitución de la comunidad (figura 1)

Se ha cultivado una planta de tabaco de 5 semanas en un mantillo vendido en el mercado y se ha cultivado a 24 °C en un fitotrón, con un fotoperiodo de 16 horas y una intensidad luminosa de 100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Al cabo de 5 semanas de crecimiento, se han tomado muestras de los suelos a partir de la rizosfera de esta misma planta. Estas muestras se han mezclado con agua estéril (1/5 p/v). La flora microbiana de la rizosfera (tamaño de los microorganismos < 100 μm) se ha obtenido mediante dos filtraciones sucesivas a través de una trama con un diámetro de 100 μm . Después de una decantación rápida, el sobrenadante (5 ml) obtenido a partir del filtrado se ha incubado a 24 °C con microcolonias de *Phytophthora parasitica* (o *P. parasitica*) preparadas como se describe en E. Galiana, S. Fourré, G. Engler, *Environ. Microbiol.* 10, 2164-2171 (2008) y lavadas tres veces con agua. La cinética de la colonización de las microcolonias de *P. parasitica* por los microorganismos de la rizosfera se ha determinado por observación al microscopio óptico.

1.2. Selección de la comunidad (figuras 2 y 3)

La mezcla de microorganismos de la rizosfera y de microcolonias de *P. parasitica* forma una biopelícula. Después de tres días de incubación, las biopelículas obtenidas se enjuagan tres veces en agua. Los microorganismos y las microcolonias de *P. parasitica* que forman las biopelículas se disocian a continuación unos de otros con suavidad al hacerlos pasar por el orificio de una pipeta Pasteur. La suspensión resultante de células de microorganismos se incuba sobre un gel de agar de una placa de Petri. El gel de agar contiene un extracto de *P. parasitica* como única fuente de nutrientes (extracto crudo de *P. parasitica* a 10 g/l; NaCl a 10 g/l; agar al 1,5% (p/v)). El extracto crudo de *P. parasitica* se ha preparado a partir de un micelio de dos semanas de edad que procede de la cepa 329 de *P. parasitica* (INRA, Sophia-Antipolis). El micelio se ha lavado con agua, se ha triturado en un polvo fino en un mortero con nitrógeno líquido, e inmediatamente después se ha liofilizado. Para seleccionar los microorganismos eucariotas, las placas de Petri se han complementado con 30 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol.

Se han identificado una treintena de aislados como microorganismos eucariotas que constituyen la biopelícula y que son capaces de crecer sobre el medio así preparado, entre los cuales los aislados anotados como I1, I2 y I3 son objeto de un análisis más detallado a continuación.

Por aislado se entiende al menos una colonia de microorganismos capaces de crecer sobre el medio preparado como se describe a continuación, en donde dichos microorganismos son idénticos entre sí.

1.3. Identificación molecular (figura 3)

Para cada uno de los aislados, se ha tomado una muestra de células de microorganismos y se ha sometido a un análisis molecular por PCR.

La muestra se ha preparado poniendo en suspensión las células, las esporas y los micelios en agua hirviendo durante 3 minutos, luego se ha enfriado con rapidez en hielo y se ha centrifugado a 10.000 xg durante 3 minutos para eliminar los desechos.

El sobrenadante (1 μl) se ha sometido a PCR para amplificar el ADN que codifica el ARN ribosómico 18S eucariota mediante el uso del cebador directo EukA o la SEQ ID n.º 2: 5'-CTGGTTGATCCTGCCAG-3' y el cebador reverso EukB o la SEQ ID n.º 3: 5'-TGATCCTTCYGCAGGTTTC-3' (G. Petroni, F. Dini, F. Verni, G. Rosati. *Mol. Phylogenet. Evol.* 22, 118-130 (2002)).

El programa de PCR ha incluido una desnaturalización inicial a 94 °C durante 120 segundos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, luego una hibridación a 56 °C durante 45 segundos y extensión a 72 °C durante 120 segundos.

1.4. Identificación de los microorganismos que tienen un impacto sobre el crecimiento de *P. parasitica* y sobre la enfermedad de la planta (figuras 4, 5A, 5B, 6, 7)

Esta identificación se ha realizado, por una parte, *in vitro* (figuras 4, 5A, 5B, 7) comparando los microorganismos representativos de cada uno de los aislados obtenidos anteriormente y dos cepas de *P. parasitica* y, por otra parte, también, en la planta (figuras 4, 6), por medio de coinfecciones.

Para las comparaciones *in vitro*, las cepas de *P. parasitica* y de los microorganismos representativos de cada aislado obtenido anteriormente se han puesto en cultivo sobre agar V8. A continuación, los discos de micelio obtenidos (5 mm de diámetro) se han transferido a una nueva placa de Petri que contiene agar V8 y se han colocado sobre la parte derecha para *P. parasitica* y sobre la parte izquierda para el aislado. La zona de inhibición que se ve alrededor del disco del aislado se ha utilizado para medir la actividad anti-*P. parasitica*.

También se ha comprobado, en portaobjetos de microscopio, el efecto de los microorganismos que proceden de cada uno de los aislados I1, I2 e I3 sobre la germinación de *P. parasitica*. Una suspensión de zoosporas (10 µl) de *P. parasitica* (4 x 10⁵ células/ml) se ha mezclado con un volumen igual del medio V8 y agua previamente incubada con cada aislado analizado, y luego se ha filtrado. El agua así acondicionada se ha preparado incubando discos miceliares en agua estéril (1 ml) durante una hora a 25 °C. Después de una centrifugación a 2000g durante 2 minutos, el sobrenadante se ha filtrado por un filtro con una porosidad de 0,2 µm para eliminar los residuos de desechos y de material celular. La centrifugación puede realizarse igualmente a un valor que se extiende en un abanico de valores que va de 1500g a 6000g y de 1 minuto a 10 minutos. Preferiblemente, la centrifugación se efectúa a 2000g durante 2 minutos.

El sobrenadante puede filtrarse o no. Generalmente se filtra después de la centrifugación para liberarse de los desechos celulares que podrían haberse mezclado con el sobrenadante en el momento de su recogida.

La suspensión obtenida después de la incubación de los discos miceliares en agua estéril durante 1 hora puede asimismo no someterse a centrifugación y ser filtrada directamente con el filtro cuya porosidad es de 0,2 µm.

El filtro puede presentar una porosidad de un valor que puede también variar en un abanico de valores que se extiende de 0,18 µm a 0,22 µm. Preferiblemente, el filtro presenta una porosidad de 0,2 µm.

Las figuras 5A y 5B ilustran un experimento realizado con el microorganismo representativo del aislado I3.

El porcentaje de germinación se ha determinado después de una incubación de dos horas de las zoosporas en presencia del sobrenadante filtrado que procede del aislado I3 a 25 °C, figura 7.

Para el análisis y el escrutinio en la planta (figura 6), la coinfección se ha realizado en el tejido parenquimatoso, una suspensión de 100 µl que contiene 500 zoosporas de *P. parasitica* y 500 esporas del microorganismo representativo de cada aislado se han infiltrado en la parte derecha de las hojas de tabaco con una edad de 4 a 6 semanas. En particular, en la figura 6 se ilustra el efecto del microorganismo representativo de cada uno de los tres aislados I1, I2, I3 sobre la hoja. Las partes áreas que muestran los síntomas típicos de la invasión por *Phytophthora* se han medido 2 días después de la coinoculación. Para evaluar el impacto de los microorganismos representativos de cada uno de los aislados sobre la progresión de la infección, estas áreas se han comparado con las áreas medidas en la parte izquierda de la hoja que se ha inoculado con 500 zoosporas solo de *P. parasitica*. Hay que destacar que, cuando se inoculan solos sin las zoosporas de *P. parasitica* (durante 7 días), ninguno de los microorganismos presentes en cada uno de los aislados es capaz de provocar el desarrollo de los síntomas sobre la planta ni de manifestar ninguna fitotoxicidad.

1.5. Identificación del ARNr 18S de los microorganismos de cada uno de los aislados I1, I2 e I3

1.5.1. Amplificación de los ARNr 18S por PCR

El ARNr 18S de los microorganismos que corresponden a cada uno de los aislados I1, I2 e I3 se ha amplificado mediante la técnica de la PCR. Para hacerlo, se ha utilizado, como se describe anteriormente, un cebador sentido de secuencia nucleotídica SEQ ID n.º 2 y un cebador antisentido de secuencia nucleotídica SEQ ID n.º 3.

1.5.2. Identificación de los microorganismos

Los amplificados que corresponden a los ARNr 18S se han clonado en el vector pGEMT-easy (Promega), se han secuenciado y han sido comparados con secuencias ya registradas en las bases de datos con ayuda del programa BLASTN

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_T YPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome).

2 – Resultados

Después del análisis de las secuencias nucleotídicas del ARNr 18S que se han amplificado, el microorganismo presente en el aislado I1 se ha identificado como un *Penicillium*. El organismo presente en el aislado I2 es un *Aspergillus*. El microorganismo presente en el aislado I3 es un *Phoma*.

- 5 La figura 5B muestra la ausencia de filamentos miceliares producidos por *P. parasitica* en presencia del sobrenadante del cultivo filtrado de microorganismos representativos del aislado I3. Así, los inventores han constatado que el sobrenadante de cultivo filtrado procedente del aislado I3 inhibe el crecimiento de *P. parasitica*.

- Según el aspecto de la hoja de tabaco obtenida después de la coinfección (figura 6), los inventores han constatado igualmente que, en el lugar donde se han inoculado las esporas de los aislados I1 e I2 mezcladas con *P. parasitica* y solo con *P. parasitica*, aparecen los síntomas de la enfermedad ocasionada por *P. parasitica*. Únicamente no se
10 presentan estos mismos síntomas en el lugar donde se han inoculado las esporas del aislado I3 con *P. parasitica*. Con este experimento, los inventores han confirmado que el microorganismo presente en el aislado I3 presenta una actividad inhibidora del crecimiento de *P. parasitica* en la planta.

- Por el hecho de que esta actividad inhibidora es potencialmente interesante para la lucha biológica contra la infección de las plantas por *P. parasitica*, se ha identificado el microorganismo presente en el aislado I3. Un estudio
15 morfológico al microscopio muestra que se trata de un hongo filamentoso cuyas esporas son de color marrón oscuro. La secuencia nucleotídica que codifica el ARNr 18S de este microorganismo o la SEQ ID n.º 1 presenta el 98% de identidad de secuencia con una secuencia nucleotídica que codifica el ARNr 18S de la cepa *Phoma herbarum*.

- De los resultados expuestos se desprende que esta nueva cepa de *Phoma* presente en este aislado I3 y/o el sobrenadante de cultivo de esta misma cepa pueden, por lo tanto, servir de base para la elaboración de una
20 composición fitosanitaria para tratar las plantas infectadas o susceptibles de serlo por al menos un oomiceto fitopatógeno.

Bibliografía

- J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg, *Science* 21, 1318-1322
(1999).
T. Danhorn, C. Fuqua, *Annu Rev. Microbiol.* (2007).
A. D. Kent, E. W. Triplett, *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 211-236 (2002).
B. Stecher, W. D. Hardt, *Trends Microbiol.* 16, 107-14 (2008).
J. Wolinska, K.C. King, *Trends Parasitol.* 25, 236-244 (2009).
E. Galiana, S. Fourré, G. Engler, *Environ. Microbiol.* 10, 2164-2171
(2008).
S. Kamoun, *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 41-60 (2006).
C. Darwin, *John Murray, London*, 67p (1859).
S.J. Gould, *Belknap (Harvard University)*, 473-474p (2002).
E. Galiana, S. Fourré, G. Engler, *Environ. Microbiol.* 10, 2164-2171
(2008).
G. Petroni, F. Dini, F. Verni, G. Rosati, *Mol. Phylogenet. Evol.* 22, 118-
130 (2002).
S. Ischii, T. Shimoyama, Y. Hotta, K. Watanabe, *BMC Microbiol.* 8, 6
(2008).

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
- 5 <120> Tratamiento de las plantas contra la infección por oomicetos
- <130> 24346WO
- 10 <150> FR n°10 51767
- <151> 11-03-2010
- <160> 3
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 1793
- <212> ADN
- 20 <213> Phoma
- <400> 1

ctggttgatc ctgccagtag tcatatgctt gtctcaaaga ttaagccatg catgtctaag 60
tataagcaat tataaccgtga aactgcgaac ggctcattaa atcagttatc gtttatttga 120
tagtacctta ctacttggat aaccgtggta attctagagc taatacatgc taaaaacctc 180
gacttcggga ggggtgtatt tattagataa aaaaccaatg cccttcgggg ctctctggtg 240
attcataata acttctcaga tcgcatggcc ttgcgccggc gacggttcat tcaaatttct 300
gccctatcaa ctttcgatgg taaggtattg gcttaccatg gtttcaacgg gtaacgggga 360
attaggggtc gattccggag agggagcctg agaaacggct accacatcca aggaaggcag 420
caggcgcgca aattacccaa tcccaatacg gggaggtagt gacaataaat actgatacag 480
ggctcttttag ggtcttgtaa ttggaatgag tacaatttaa acctctaac gaggaacaat 540
tggagggcaa gtctggtgcc agcagccgcg gtaattccag ctccaatagc gtatattaaa 600
gttggttgca ttaaaaagct cgtagttgaa actttggcct ggctggcggg tccgcctcac 660
cgcgtgcatt cgcgcggccg ggccttttct tctggagaac cgcgtgccct tcaactgggtg 720
tggtggggac caggactttt actttgaata aatcagagtg ttcaaagcag gcatttgctc 780
gaatacgtaa gcatggaata atagaatagg acgtgcggtc ttattttggt ggtttctaag 840
accgccgtaa tgattaatag ggacagtcgg gggcatcagt attcaattgt cagaggtgaa 900
attcttggat ttattgaaga ctaactactg cgaaagcatt tgccaaggat gttttcatta 960
atcagtgaac gaaagttagg ggatcgaaag cgatcagata ccgtcgtagt ctttaaccata 1020
aactatgccg actagggatc gggcgggtgt actattttga ctcgctcggc accttacgag 1080
aaatcaaagt gtttgggttc tggggggagt atggtcgcaa ggctgaaact taaagaaatt 1140
gacggaaggg caccaccagg cgtggagcct gcggcctaatt ttgactcaac acggggaaac 1200
tcaccagggtc cagatgaaat aaggattgac agattgagag ctctttcttg atttttcagg 1260
tggtggtgca tggccgttct tagttggtgg agtgatttgt ctgcttaatt gcgataacga 1320
acgagacctt aacctgctaa atagccaggc tagctttggc tggtcgccgg cttcttagag 1380
ggactatcgg ctcaagccga tggaagtgtg aggcaataac aggtctgtga tgcccttaga 1440
tggtctgggc cgcacgcgcg ctacactgac agagccaacg agtttttttc cttggccgaa 1500
aggcctgggt aatcttgtaa aactctgtcg tgctggggat agagcattgc aattattgct 1560
cttcaacgag gaatgcctag taagcgcgtg tcatcagcac gcgttgatta cgtccctgcc 1620
ctttgtacac accgcccgtc gctactaccg attgaatggc tcagtgaggc cttcggactg 1680
gctcaggag gttggcaacg accaccctga gccggaaagt tcgtcaaact cggtcattta 1740
gaggaagtaa aagtcgtaac aaggtttccg taggtgaacc tgcagaagga tca 1793

5 <210> 2
<211> 17
<212> ADN
<213> Eucariota

10 <400> 2
ctggttgatc ctgccag

17

<210> 3
<211> 18

ES 2 521 591 T3

<212> ADN

<213> Eucariota

<400> 3

5 tgatccttcy gcaggttc

18

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Phoma* depositada en la Colletion Nationale de Cultures de Micro-organismes (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos) del Instituto Pasteur el 25 de febrero de 2010 con el n.º CNCM I-4278.
2. Cepa según la reivindicación 1, caracterizada por que inhibe al menos parcialmente el crecimiento de los oomicetos fitopatógenos.
3. Cepa según la reivindicación 1, caracterizada por que inhibe el crecimiento de los oomicetos del género *Phytophthora*.
4. Cepa según la reivindicación 3, caracterizada por que inhibe el crecimiento de *Phytophthora parasitica*.
5. Sobrenadante de cultivo de la cepa según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho sobrenadante inhibe al menos parcialmente el crecimiento de los oomicetos fitopatógenos.
6. Sobrenadante según la reivindicación 5, caracterizado por que comprende al menos un metabolito de pequeño tamaño o igual a un valor comprendido entre 0,18 µm y 0,22 µm, preferiblemente inferior o igual a 0,2 µm.
7. Sobrenadante según una de las reivindicaciones 5 a 6, caracterizado por que el sobrenadante de cultivo inhibe el crecimiento de *Phytophthora parasitica*.
8. Procedimiento de obtención del sobrenadante según una de las reivindicaciones 5 a 7, en donde dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:
 - poner a cultivar la cepa según la reivindicación 1,
 - poner en suspensión el cultivo obtenido en el agua, caracterizado por que comprende la etapa siguiente
 - filtrar la suspensión por una trama de 0,18 µm a 0,22 µm, preferiblemente 0,2 µm,
 - recuperar la solución filtrada.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
 - antes de filtrar la suspensión, centrifugar la suspensión entre 1500g y 6000g durante 1 a 10 minutos, preferiblemente a 2000g durante 2 minutos.
10. Procedimiento de obtención del sobrenadante según una de las reivindicaciones 5 a 7, que comprende las etapas siguientes:
 - poner a cultivar la cepa según la reivindicación 1,
 - poner en suspensión en agua el cultivo obtenido, caracterizado por que comprende la etapa siguiente
 - centrifugar la suspensión entre 1500g y 6000g durante 1 a 10 minutos, preferiblemente a 2000g durante 2 minutos, y luego
 - recuperar el sobrenadante.
11. Composición fitosanitaria, caracterizada por que comprende la cepa de *Phoma* según la reivindicación 1.
12. Composición fitosanitaria, caracterizada por que comprende un sobrenadante de cultivo según una de las reivindicaciones 5 a 7.
13. Composición fitosanitaria, caracterizada por que comprende la composición según la reivindicación 11 y la composición según la reivindicación 12.
14. Utilización de la cepa de *Phoma* según la reivindicación 1, para la fabricación de una composición fitosanitaria destinada a tratar las plantas contra la infección por oomicetos fitopatógenos.
15. Utilización de un sobrenadante de cultivo según una de las reivindicaciones 5 a 7, para la fabricación de una composición fitosanitaria destinada a tratar las plantas contra la infección por oomicetos fitopatógenos.
16. Utilización de la cepa de *Phoma* según la reivindicación 1 y del sobrenadante de cultivo según una de las reivindicaciones 5 a 7, para la fabricación de una composición fitosanitaria destinada a tratar las plantas contra la infección por oomicetos fitopatógenos.

Figura 1

Constitución de una comunidad de microorganismos

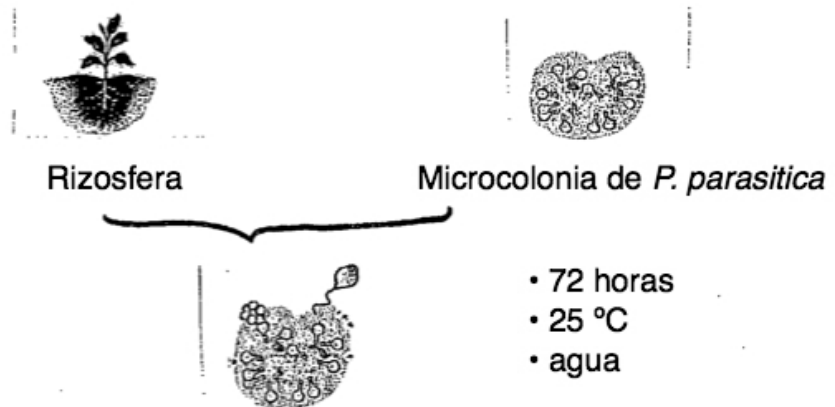


Figura 2

Constitución de la biopelícula

Día 0
1.^{er} día
2.^o a 3.^{er} día
4.^o a 6.^o día

P. parasitica
Bacteria
Ciliado
Levadura

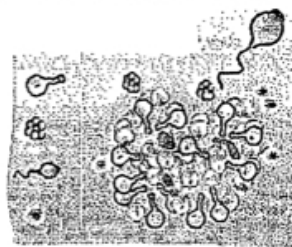


Figura 3

Selección de microorganismos entre la comunidad de microorganismos

Disociación de microorganismos y de las colonias de *P. parasitica*

Crecimiento sobre un extracto de *P. parasitica*

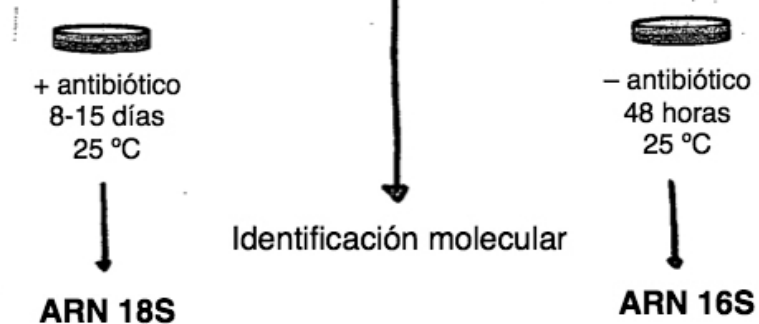


Figura 4

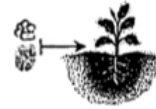
Identificación de los aislados

Competición *in vitro* de los aislados - *P. parasitica*



- Comparación con esporas
- Comparación con micelio

Impacto *in vivo* de la enfermedad



- Coinfección de la planta
- Pretratamiento

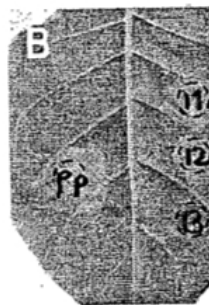
Figura 5A



Figura 5B

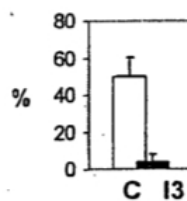


Figura 6



- I1: Extracto de *P. parasitica* mezclado con un aislado de *Penicillium*
 I2: Extracto de *P. parasitica* mezclado con un aislado de *Aspergillus*
 I3: Extracto de *P. parasitica* mezclado con un aislado de una cepa de *Phoma*
 Pp: Extracto de *P. parasitica* sólo

Figura 7



Agua

Sobrenadante del cultivo