

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 353**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12R 1/885 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2008 E 08763785 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2274414**

54 Título: **SC1 de Trichoderma atroviride para el biocontrol de enfermedades fúngicas en plantas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.01.2015

73 Titular/es:

TRENTINO SVILUPPO S.P.A. (50.0%)
Via Fortunato Zeni, 8
38068 Rovereto, (TN), IT y
FONDAZIONE EDMUND MACH (50.0%)

72 Inventor/es:

PERTOT, ILARIA;
LONGA, CLAUDIA MARIA;
PRODORUTTI, DANIELE;
MICHELON, LORENZA y
SAVAZZINI, FEDERICA

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 526 353 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

SC1 de *Trichoderma atroviride* para el biocontrol de enfermedades fúngicas en plantas

5 **Campo de la invención**

[0001] El campo de la presente invención es el control biológico de enfermedades de las plantas producidas por hongos patógenos por un agente de biocontrol, representado por una novedosa cepa de *Trichoderma atroviride*.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] Se ha conseguido la sustitución o reducción de fungicidas químicos mediante el uso de fungicidas en base biológica, un enfoque que se encuentra dentro de la definición de control biológico como se ha propuesto por Cook y Baker (1983): "Control biológico es la reducción de la cantidad de inóculo o actividad producida por la enfermedad de un patógeno realizado por o mediante uno o más organismos distintos del hombre". Esta amplia definición incluye el uso de variantes menos virulentas del patógeno, cultivares más resistentes del huésped y antagonistas microbianos "que interfieren con la supervivencia o actividades productoras de enfermedad del patógeno".

[0003] Se requiere una evaluación más compleja de las interacciones medioambientales para usar tales agentes de biocontrol (ABC). De hecho, las condiciones medioambientales afectan no solo a la supervivencia de los ABC, sino también a su eficacia contra los patógenos (Paulitz, 2000). Los ABC que son más flexibles en términos de adaptación medioambiental pueden desarrollarse más fácilmente en productos comerciales, ya que sus aplicaciones y mercados diana pueden ser más amplios que aquellos de ABC que requieren condiciones medioambientales específicas.

[0004] La selección de cepas antagonistas de *Trichoderma* con tolerancia potenciada a condiciones medioambientales desfavorables puede aumentar la fiabilidad de los programas de biocontrol basados en *Trichoderma* (Kredics y col., 2000). También es importante observar que los ABC más eficaces para su uso contra patógenos de las plantas son aquellos que tienen mejor tolerancia al estrés que los patógenos diana (Kredics y col., 2000; 2004).

[0005] *Trichoderma* es un género cosmopolita, que puede colonizar tierras, rizoesferas y filoesferas. Las especies de *Trichoderma* se encuentran frecuentemente en madera en descomposición y material vegetal. Varias cepas de *Trichoderma* son productores económicamente importantes de enzimas industriales.

[0006] Ya se han usado cepas de *Trichoderma* como agentes de biocontrol contra numerosos patógenos de las plantas y se han desarrollado algunos para su uso como productos de biocontrol comercial (es decir, *Trichoderma harzianum*, conocido como Trichodex®) para cultivos de campo y de invernadero (Elad, 2000; Harman, 2000).

[0007] Sin embargo, existe una gran variabilidad en términos de actividad de biocontrol, especificidad, mecanismo de acción, producción de metabolitos y supervivencia en tierra o sobre la planta entre especies de *Trichoderma*, que afectan su uso como ABC (Benitez y col., 2004). Además, todavía hay varias patologías importantes, tales como aquellas producidas por el género *Armillaria* sobre la vid para las que ni se han aislado ni caracterizado agentes de biocontrol completamente eficaces.

45 **Breve descripción de los dibujos**

[0008]

50 **Figura 1. Crecimiento radial de SC1 de *Trichoderma atroviride* a diferentes temperaturas.** Se cultivó SC1 de *Trichoderma atroviride* sobre agar de dextrosa de patata (PDA) y se incubó a diferentes temperaturas: 10 (◇), 15 (●), 20 (■), 25 (Δ) y 30 °C (×). No se observó crecimiento a -1, 5, 37 ó 40 °C. Los puntos de datos son medias de diez duplicados. Los valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) según la prueba de Tukey. El periodo antes del inicio del crecimiento (periodo de latencia) fue 1 día a 20, 25 y 30 °C, 2 días a 15 °C y 3 días a 10 °C.

55 **Figura 2. Efecto del pH en el crecimiento radial de SC1 de *Trichoderma atroviride*.** El crecimiento se llevó a cabo sobre agar de dextrosa de patata (PDA) a diferentes niveles de pH. pH 3 (Δ), 4 (□), 5 (▲), 6 (+), 7 (●), 8 (◇), 9 (x) y 10 (■). Los puntos de datos son medias de diez duplicados. Valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) según la prueba de Tukey.

60 **Figura 3. Efecto de la actividad del agua sobre la tasa de crecimiento de SC1 de *Trichoderma atroviride*.** Se cultivó SC1 de *Trichoderma atroviride* sobre agar de dextrosa de patata modificado con glicerol a los niveles de actividad del agua de 0,998 (▲), 0,990 (■), 0,980 (Δ), 0,960 (×), 0,940 (●) y 0,910 (○). Los puntos de datos son medias de diez duplicados. Valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) según la prueba de Tukey. El periodo antes del inicio del crecimiento (periodo de desfase) fue 1 día a 0,998, 0,990 y 0,980, 2 días a 0,940 y 4 días a 0,910.

65 **Figura 4. Amplificación múltiple de *ech42* y *tga3*.** La amplificación se llevó a cabo usando la sonda

específica ech42 (■) y la sonda general *tga3* (○) de ADN puro de SC1 de *Trichoderma atroviride*. Las dos curvas de dilución se solapan y tienen la misma eficiencia, coeficiente de determinación (R^2) y pendiente.

Figura 5. Recuperación de ADN de SC1 de *Trichoderma atroviride* por PCR en tiempo real. La cantidad de ácido nucleico se expresa como el número de copias del genoma haploide en un gramo de tierra inoculada con una cantidad conocida de conidios. La desviación estándar (%) se calculó a partir de seis cuantificaciones independientes.

Figura 6. Supervivencia de SC1 de *Trichoderma atroviride* sobre hoja de fresa evaluada como unidades formadoras de colonias (UFC). Se inocularon hojas en el día 0 pulverizando una suspensión de conidios-agua (10^6 UFC·ml⁻¹). Los puntos de datos representan los promedios de diez duplicados. Los datos se transformaron por log (x). Las barras de error representan las desviaciones estándar de las medias.

Figura 7. Supervivencia de SC1 de *Trichoderma atroviride* en microcosmos de tierra estática. El hongo se aplicó a una tasa de 10^6 UFC·g⁻¹ de tierra en el día 0 a tres tierras estériles (a) y no estériles (b) diferentes: Tierra 1 (●), Tierra 2 (□) y Tierra 3 (Δ), los puntos de datos representan los promedios de cinco duplicados y se transformaron por log (x). Diferentes letras para cada día indican valores que son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) según la prueba de Tukey.

Figura 8. Efecto de SC1 de *Trichoderma atroviride* sobre la gravedad de la infección por el oídio. Se inocularon artificialmente plantas de pepino (panel A) y calabacín (panel B) con conidios de *Podosphaera xanthii* y comparación con patrones no tratados, de azufre y dos de biocontrol (T39 de *Trichoderma harzianum* - nombre comercial Trichodex® - y F122 de *T. atroviride*). Las evaluaciones se hicieron dos semanas después de la gravedad de la puntuación de la inoculación (porcentaje de tejido de hoja infectado). Se evaluaron cinco duplicados (plantas) por tratamiento. Las columnas con la misma letra no son significativamente diferentes según HSD de Tukey ($P \leq 0,05$). Para la inoculación artificial, se pulverizaron aproximadamente 5 ml de una suspensión acuosa de conidios (10^7 conidios ml⁻¹) sobre cada planta. Las aplicaciones diarias empezaron 12 horas después de la inoculación.

Figura 9. Eficacia de SC1 de *Trichoderma atroviride* sobre el crecimiento de los tres principales agentes causales de la enfermedad de Esca (*Phaeomoniella chlamydospora*: panel A; *Phaeoacremonium aleophilum*, panel B; *Fomitiporia mediterranea*, panel C). La eficacia del control se calculó según la fórmula: $[(C-T)/C] \times 100$, en la que C es el crecimiento del patógeno sin el tratamiento y T es el crecimiento con el tratamiento de SC1 de *Trichoderma atroviride*. La inoculación de los agentes causales de Esca y SC1 de *T. atroviride* se hicieron sobre agar de dextrosa de patata en placas de petri. Las gráficas representan el promedio de cinco duplicados (placas de petri).

Figura 10. Crecimiento micelar de *Armillaria mellea* y *Armillaria gallica* (agentes causales de la podredumbre de la raíz) en presencia de SC1 de *Trichoderma atroviride* y sin (no tratados). El efecto del experimento de T39 de *Trichoderma harzianum* - Trichodex® - se presenta en el presente documento como comparación estándar. El crecimiento se expresa como promedio del diámetro de cinco duplicados cultivados sobre trozos de madera sobre PDA sobre placas de petri a 20 °C.

Figura 11. Porcentaje de plantas de fresa infectadas por *Armillaria mellea* y *A. gallica* (muertas) después del tratamiento de la tierra. Se comparó el efecto de SC1 de *Trichoderma atroviride* con el efecto sin tratar. Se usó T39 de *Trichoderma harzianum* - Trichodex® - como comparación para *A. gallica* y se usa F122 de *T. atroviride* como comparación para *A. mellea*. Los valores son porcentajes calculados sobre 10 plantas duplicadas.

Resumen de la invención

[0009] Una realización de la presente invención es SC1 de *Trichoderma atroviride*, CBS n°122089, como agente de biocontrol, es decir, para tratar enfermedades fúngicas de plantas.

[0010] La segunda realización de la presente invención es una composición agrícola que comprende SC1 de *Trichoderma atroviride* como principio activo en una cantidad eficaz. Las composiciones de la presente invención pueden comprender además un segundo agente de biocontrol y/o un aditivo, un emulsionante, un nutriente para las plantas, un agente humectante, un micronutriente para las plantas o un sustrato, en el que dicho sustrato se selecciona del grupo que consiste en: un medio de cultivo nutriente, un cereal o un derivado de los mismos, un abono, un vegetal o una parte del mismo, turba, madera o un trozo de la misma, arcilla o cortezas.

[0011] Otra realización es un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad de las plantas producida por un hongo patógeno seleccionado del grupo de aquellos que causan: enfermedades de la madera (*Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Fomitiporia mediterranea*), enfermedades foliares (el agente causante del oídio *Podosphaera xanthii*), enfermedades de las frutas y las flores (*Botrytis cinerea*) y enfermedades de la raíz producidas por el género *Armillaria* (*Armillaria mellea* y *A. gallica*).

[0012] El tratamiento puede llevarse a cabo directamente sobre la planta o sobre una parte de la planta, o indirectamente aplicando sustrato enriquecido en SC1 de *Trichoderma atroviride*, CBS n° 122089 en la tierra o sobre ella, en estrecha proximidad de la planta. Las plantas que se benefician de este tratamiento están seleccionadas preferentemente del grupo que consiste en: *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, *Vitaceae*, *Cruciferae*, *Compositae*, *Ubelliferae*, *Solanaceae* y *Liliaceae*. Otras realizaciones de la presente invención son sustratos que comprenden una cantidad eficaz del microorganismo SC1 de *Trichoderma atroviride* o tratado con composiciones que comprenden

una cantidad eficaz de dicha cepa. Un sustrato preferido se representa por corteza o arroz hervido.

[0013] Otra realización se representa por un procedimiento molecular para la detección específica de SC1 de *Trichoderma atroviride* en la que la amplificación en paralelo del gen de endoquitinasa 42 (*ech42*), nº de acceso GenBank AB041753.1 y de un gen de la subunidad alfa de la proteína G (*tga3*), nº de acceso GenBank AF452097.1 se logra con conjuntos de cebadores adecuados y en el que en una muestra que comprende dicha SC1 de *Trichoderma atroviride* se observan dos nucleótidos polimórficos en la posición 185 y 196 del gen de endoquitinasa 42.

Descripción detallada de la invención

[0014] Un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente de biocontrol que pertenece a la especie *Trichoderma atroviride*, cepa SC1, para la supresión del desarrollo de enfermedades fúngicas sobre la parte aérea de las plantas y sobre las raíces.

[0015] Según una realización preferida, la cepa SC1 de *Trichoderma atroviride* se depositó el 27 de noviembre de 2007, bajo el Tratado de Budapest en CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) bajo CBS nº 122089.

[0016] Según el principal aspecto de la presente invención, la cepa SC1 de *Trichoderma atroviride* se propone para suprimir y para prevenir el desarrollo de patógenos de las plantas, en particular: podredumbres de las frutas y de la raíz, tales como aquellas producidas por *Botrytis cinerea* y *Armillaria spp.*, oídios, enfermedades de la madera (enfermedad de Esca). Según una realización preferida, la invención proporciona un procedimiento de supresión o prevención del desarrollo de enfermedades fúngicas sobre plantas caracterizado por usar composiciones que comprenden una cantidad eficaz de SC1 de *Trichoderma atroviride* en una cantidad de al menos 10^2 - 10^3 conidios ml^{-1} o g^{-1} cuando se usa composición sólida.

[0017] SC1 de *Trichoderma atroviride* es un hongo mesófilo como la mayoría de *Trichoderma spp.* (Klein y Eveleigh, 1998). Puede utilizar un amplio intervalo de compuestos como únicas fuentes de carbono y de nitrógeno. El crecimiento fúngico en medios de cultivo es superior con algunas fuentes de nitrógeno tales como extracto de levadura, nitrito, triptona, peptona, glutamina y asparagina o algunas fuentes de carbono tales como manosa, galactosa, sacarosa, extracto de malta, celobiosa, glucosa y trehalosa.

[0018] SC1 de *T. atroviride* sobrevive en un intervalo de temperatura comprendido de -1 a 35 °C y crece en un intervalo de temperaturas comprendido de 5 a 30 °C. La temperatura óptima para el crecimiento es 25 °C \pm 1 °C, aunque el crecimiento radial fúngico a 20 °C no es significativamente diferente del crecimiento observado a 25 °C. La temperatura máxima para la supervivencia de SC1 de *T. atroviride* (30 °C) es inferior a la temperatura del cuerpo humano, que es una buena indicación de que este hongo no es patógeno para los seres humanos.

[0019] Los niveles de tolerancia del pH de SC1 de *T. atroviride* se encuentran dentro del intervalo común para las cepas de *Trichoderma*, es decir, un intervalo de pH comprendido de 3 a 10. El límite mínimo de la tolerancia de la actividad del agua (a_w) de SC1 de *T. atroviride* es 0,910. El valor preferido de actividad del agua es 0,998, que se corresponde con valores de condiciones de alta humedad relativa preferidas por la mayoría de los patógenos de las plantas fúngicos (90-100 %).

[0020] SC1 de *Trichoderma atroviride* se caracteriza por las siguientes propiedades:

- es particularmente activo contra enfermedades producidas por *Armillaria spp.* y contra los agentes causales de la "enfermedad de Esca" para la que no se conocen pesticidas químicos eficaces. Según la invención, el término *Armillaria spp.* cubre en particular *Armillaria mellea* y *Armillaria gallica*, el término "enfermedad de Esca" cubre los patógenos más importantes que causan la enfermedad de Esca, en particular *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Fomitiporia mediterranea*. *Armillaria spp.* afecta a más de 400 especies de plantas (cultivos y árboles forestales). Los patógenos de la "enfermedad de Esca" afectan la vid.
- es más eficaz contra oídio (producido por *Podosphaera xanthii*) que otras cepas conocidas de *Trichoderma*, tales como T39 de *Trichoderma harzianum* (nombre comercial Trichodex®) o F122 de *T. atroviride* (Longa, 2007). Los oídios son enfermedades fúngicas producidas por muchas especies diferentes de hongos en el orden Erysiphales (Spencer, 1978) y producen daños económicamente importantes en particular a la uva, manzana, fresa, cultivos hortícolas y florícolas;
- persiste en tierra a niveles eficaces durante periodos prolongados (más de un año)
- puede dispersarse fácilmente sobre partes vegetales o de madera, en las que sobrevive como agente antifúngico durante más de un año.

[0021] Varias pruebas llevadas a cabo con SC1 de *T. atroviride*, que se detallarán mejor en la parte experimental, permiten que se proponga como agente de biocontrol óptimo para la supresión de enfermedades fúngicas sobre plantas.

[0022] Según una realización preferida, la preparación de composiciones agrícolas de SC1 de *T. atroviride* se lleva a cabo inoculando SC1 de *T. atroviride* (algunas esporas lavadas de las placas de cultivo son normalmente

suficientes) sobre un sustrato nutritivo común en suspensión líquida o sobre sustrato sólido para obtener al menos 10^2 - 10^3 conidios/ml⁻¹ o g⁻¹ de sustrato (concentración activa).

5 [0023] El medio líquido o semisólido más comúnmente usado comprende: caldo nutritivo, agar nutritivo de dextrosa de patata (PDA), agar de extracto de malta, agar de malta, caldo de LB y similares conocidos para aquellos expertos, en el que los hongos se cultivan bajo agitación continua, durante al menos 48, preferentemente 72 horas o hasta que se producen conidios, a una temperatura de crecimiento óptima comprendida de 20 a 30 °C o preferentemente de 22 a 26 °C o a aproximadamente 25 °C ± 1 °C, durante al menos 48 h. En estas condiciones los primeros conidios se producen después de al menos 48 h.

10 [0024] Un sustrato sólido preferido comprende un cereal esterilizado (tal como arroz hervido o trigo), harina o cereales molidos, o un sustrato rico en hidratos de carbono similar, en el que SC1 de *T. atroviride* se inocula y se incuba durante al menos una semana de 20 a 30 °C o preferentemente de 22 a 26 °C o aproximadamente 25 °C ± 1 °C. También son adecuados los derivados de cereales tales como harina o cereales molidos.

15 [0025] El tratamiento y/o la prevención de plantas se lleva a cabo usando cultivos de SC1 de *T. atroviride* cultivados en medios líquidos o semisólidos o sobre un sustrato sólido y aplicando tal suspensión de SC1 de *T. atroviride* sobre partes de la planta o aplicando el sustrato enriquecido en SC1 sobre o en la tierra en estrecha proximidad de la planta en necesidad de un tratamiento tal.

20 [0026] El tratamiento puede llevarse a cabo aplicando composiciones agrícolas a plantas, sobre las hojas de plantas, sobre heridas producidas durante el corte o poda, o a la tierra para suprimir el desarrollo de enfermedades fúngicas sobre las raíces. Los tratamientos se aplican por pulverización sobre plantas como fungicida común, con una elección del momento oportuno que debe adaptarse a la enfermedad específica (es decir, antes de la infección, en una etapa fenológica específica de plantas tales como trasplante, florecimiento, post-cosecha). Los tratamientos también pueden pulverizarse o inyectarse en la tierra, mezclarse con la tierra sobre varios sustratos y diferentes formulaciones (es decir, gránulos, mezclados con arcilla o productos similares, cortezas, materia vegetal u otra materia orgánica o similares o derivados). Los tratamientos pueden aplicarse durante el periodo vegetativo de la planta o durante la dormancia. El tratamiento puede pulverizarse después de la poda o aplicarse directamente a las heridas de la poda para prevenir infecciones. Los tratamientos pueden aplicarse semanalmente o más frecuentemente, además de una vez al año. El tratamiento puede aplicarse una vez (es decir, en el momento de la siembra en la tierra) o repetirse según se necesite.

30 [0027] Una alta persistencia en la tierra y la facilidad de dispersión sobre soportes sólidos tales como cortezas convierte el presente microorganismo particularmente adecuado para tratar plantas y/o áreas que comprenden plantas, minimizando el número de tratamientos.

35 [0028] Por sustrato de cultivo se indica un soporte de cultivo orgánico que puede ser tanto líquido, sólido, semisólido (gelatina) como que puede ser orgánico tal como arroz, corteza o trozos de madera o abonos vegetales, tales como turba, o inorgánicos (es decir, mineral) tales como arcilla. Los sustratos pueden tener tanto un nutriente como una función de matriz, o ambos. Los trozos de madera, cortezas o sustratos inorgánicos se pre-tratan preferentemente con un nutriente antes de la inoculación de SC1.

40 [0029] Digno de mención, el crecimiento sobre trozos de corteza no es posible con otras cepas de *T. atroviride*, tales como la cepa 122F. Por tanto, esta realización representa otra característica distintiva de la cepa SC1 según la presente invención.

45 [0030] También pueden recogerse conidios de SC1 de *T. atroviride* (es decir, por un flujo de aire o lavando un sustrato de cultivo) y dispersarse en un líquido o un nutriente líquido. Tal suspensión, o composición agrícola, se aplica directamente a la planta o a la tierra en estrecha proximidad a la planta. Se aplica preferentemente en combinación con nutrientes tales como una fuente de carbono (es decir, un azúcar) y una fuente de nitrógeno, tal como aminoácidos, péptidos, factores nutritivos o micronutrientes de las plantas para un mejor mantenimiento del microorganismo *in situ*.

50 [0031] La composición puede comprender además emulsionantes, tales como lecitina, saponinas, agentes humectantes, tales como Tween 80, o similares, protectores de UV, antioxidantes con emulsionantes, diluyentes, agentes humectantes, adyuvantes de pulverización. Para los fines de la presente invención, cualquier sustrato de cultivo tanto sólido como líquido, que comprende una cantidad eficaz de 10^2 - 10^3 conidios ml⁻¹ o g⁻¹ de SC1 de *T. atroviride*, se considera una composición agrícola.

55 [0032] Suspensiones o composiciones que comprenden al menos 10^2 - 10^3 ml⁻¹ o g⁻¹ de conidios se aplican directamente sobre la planta o partes de la planta, tales como raíces, hojas, semillas o fruto, o indirectamente a la tierra, preferentemente sobre los anteriores soportes sólidos.

60 [0033] En las composiciones agrícolas anteriores, la cepa SC1 puede mezclarse opcionalmente con un segundo agente de biocontrol o adicional, suplementos, fertilizantes, minerales, hormonas vegetales, abonos para el

crecimiento de las plantas, pesticidas químicos no tóxicos para SC1 de *T. atroviride* o ceras para proteger las heridas de poda en el agua de irrigación.

5 **[0034]** Uno de los procedimientos más preferidos para tratar tierra con SC1 de *T. atroviride* es permitir que ésta crezca sobre un sustrato tal como un cereal (es decir, arroz hervido), o corteza o trozos de madera o abonos vegetales tales como turba y distribuir dichos soportes sobre o en la tierra en estrecha vecindad a la planta/plantas que van a tratarse.

10 **[0035]** El crecimiento de una cantidad eficaz de cultivo de SC1 de *T. atroviride* (10^2 - 10^3 conidios·ml⁻¹ o g⁻¹) sobre tal sustrato sólido (es decir, trozos de corteza) se lleva a cabo preferentemente pretratándolo con un medio microbiológico (tal como caldo de dextrosa de patata, extracto de malta, caldo nutritivo o similares) o cualquier sustancia nutritiva que contenga un carbono y una fuente de nitrógeno (tal como extracto de carne, peptona, cereales molidos, extracto de levadura, sacarosa o similares), inocular tal sustrato con SC1 de *T. atroviride* e incubarlo en la condición descrita anteriormente durante al menos una semana o hasta que se obtenga la colonización.

15 **[0036]** La composición también puede prepararse lavando conidios fuera de las placas infectadas o sustratos de cultivo y pulverizando tales suspensiones sobre las partes aéreas de la planta antes de la infección patógena, semanalmente, en alguna etapa fenológica de la planta específica o después de algunas prácticas agrícolas tales como poda, corte, siembra.

20 **[0037]** Las plantas a las que se aplica satisfactoriamente están preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en: *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, *Vitaceae*, *Cruciferae*, *Compositae*, *Ubelliferae*, *Solanaceae* y *Liliaceae*. Plantas particularmente preferidas son *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, *Vitaceae*.

25 **[0038]** El tratamiento, tanto por un sustrato sólido inoculado (es decir, cortezas o abonos vegetales) como por otros medios tales como pulverización, se lleva a cabo en cualquier momento del cultivo de la planta para proporcionar el control de patógenos transmitidos por la tierra existentes o para prevenir nuevas infecciones.

30 **[0039]** Un procedimiento preferido de tratamiento de la rizoesfera con el agente de biocontrol de la presente invención se logra cultivando SC1 de *T. atroviride* en arroz hervido esterilizado (u otro cereal) durante algunos días (mínimo una semana, normalmente 15 días) a una temperatura comprendida dentro del intervalo óptimo, preferentemente a aproximadamente 25 °C ± 1 °C, hasta que se obtiene una dosis de inóculo óptima en el intervalo de 10^7 - 10^8 conidios/100 g de arroz hervido o 1×10^6 UFC·g⁻¹ de tierra. Según esta realización, el agente de biocontrol se aplica directamente como matriz de arroz enriquecida en hongos.

35 **[0040]** Con el fin de monitorizar el destino y comportamiento de un microorganismo liberado en el entorno, que es de máxima importancia para el control de ABC, se ha desarrollado un enfoque molecular (PCR en tiempo real) y representa otra realización de la presente invención.

40 **[0041]** Este procedimiento permite seguir y cuantificar SC1 de *T. atroviride* en el entorno, específicamente identificar la cepa liberada, diferenciándola de la comunidad microbiana nativa y siguiendo su población dinámica con el tiempo.

45 **[0042]** En realidad, el registro de un agente de biocontrol (ABC) específico como pesticida en Europa requiere una evaluación del riesgo basada en la persistencia y multiplicación de ABC en el entorno, además de una evaluación de cualquier posible contaminación (residuos de ABC viables y no viables) de alimentos.

50 **[0043]** La prueba molecular desarrollada según otra realización de la presente invención se basa en el gen de endoquitinasa (*ech42*) de SC1 de *T. atroviride* (Carsolio y col., 1994). Por tanto, los cebadores de PCR en tiempo real y el conjunto de sondas TaqMan específico de cepa (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) se diseñaron basándose en dos desapareamientos de nucleótidos sobre la hebra de 3' del gen *ech42*, en la posición 185 y 196 según la numeración de la secuencia de acceso del GenBank AB041753.1. Se diseñaron un segundo conjunto de cebadores y sonda TaqMan para el gen *tga3*, que codifica la subunidad α de la proteína G (Tabla 1).

55 **[0044]** La PCR usando los cebadores para *ech42* y *tga3* produjo productos de amplificación específicos a partir de todo el ADN de cepas de *Trichoderma* spp., pero no otros hongos de muestras de tierra (es decir, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp.). Los productos dieron un único punto de fusión para cada gen, que indica que los cebadores solo amplificaron productos de *ech42* y *tga3*.

60 **[0045]** En cambio, cuando la PCR en tiempo real se lleva a cabo también en presencia de una sonda TaqMan de *ech42* que contiene las dos mutaciones puntuales específicas de SC1 de la secuencia del gen *ech42* (preferentemente SEC ID N° 3), solo SC1 de *T. atroviride* produce una única señal y no se produce la hibridación de productos de amplificación de sondas para los otros hongos (cepa F122 y SB18 incluidas) en muestras de vid y tierra, confirmando la alta especificidad de la sonda de *ech42*.

65

[0046] La amplificación del dúplex de la sonda TaqMan para *ech42* y *tga3* para la serie de concentraciones de ADN de SC1 de *T. atroviride* se produjo al mismo umbral para cada concentración dada. Esto demuestra que hay una única copia del amplicón de *ech42* en el genoma y una única copia del gen *Tga3*, y que estas dos secuencias tienen curvas patrón similares de manera que representan conjuntos de cebadores de amplificación adecuados, como se confirma por el hecho de que las reacciones de PCR para cada una de estas dos secuencias avanzó con niveles similares de eficiencia (Figura 4).

[0047] Este procedimiento da un límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) de 5 copias del genoma por reacción de PCR. Para las muestras de tierra, el LOD calculado aumentó a 35 copias por mezcla de reacción, equivalente a $6,2 \times 10^3$ conidios por g de tierra, y LOQ osciló de 2×10^4 a 3×10^4 g de tierra⁻¹. La exactitud del procedimiento es muy alta a los cinco niveles de concentración de conidios probados como se muestra en la Parte experimental. El experto a partir de las variaciones alélicas en *Ech42 P* identificado en el presente procedimiento puede identificar fácilmente conjuntos de cebadores alternativos y diferentes sondas que todavía comprenden los dos desapareamientos identificados específicos para la cepa SC1. Por tanto, diferentes sondas moleculares están posiblemente ligadas a la sonda y/o cebador.

[0048] En la siguiente tabla se muestran cebadores de PCR en tiempo real y sondas diseñados para la detección y cuantificación de SC1 de *T. atroviride*. Los desapareamientos de bases en la sonda TaqMan para *ech42* están en negrita.

Cebadores y sondas	Secuencia (5'-3')	Producto amplificado (pb)
	Gen de endoquitinasa 42 (<i>ech42</i>)	
<i>Ech42</i> Dir	GTTCTGAGGCTGGAAGTTGC SEC ID N° 1	
<i>Ech42</i> Inv	ACGCCGTCTACTTCACCAAC SEC ID N° 2	112
<i>Ech42 P</i>	6FAM-TACCCCTTCAATCACCAATTGTTAG-TAMRA SEC ID N° 3	
	Gen de la subunidad α de la proteína G (<i>tga3</i>)	
<i>Tga3</i> Dir	TGTTGAAGCATTGGGTTTGA SEC ID N° 4	
<i>Tga3</i> Inv	TGATTGAGGTGACGTTCTCG SEC ID N° 5	132
<i>Tga3 P</i>	HEX-AAGGAGTGAACGAAAGAAGTGGA-TAMRA SEC ID N° 6	

[0049] Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención.

PARTE EXPERIMENTAL

Ejemplo 1. Aislamiento y crecimiento de SC1 de *Trichoderma atroviride*

[0050] Se aisló la cepa fúngica SC1 de *T. atroviride* en Italia del norte de la madera de avellano en descomposición y se obtuvo en cultivo puro por el procedimiento de una única spora. Se mantuvo sobre agar de dextrosa de patata (PDA; Oxoid, Cambridge, RU) inclinado a 4 °C en la Colección de Microorganismos SafeCrop (Istituto Agrario di San Michele all'Adige) y se depositó en la colección CBS bajo el Tratado de Budapest (CBS 122089). La cepa se identificó morfológicamente como *Trichoderma atroviride* P. Karst. y su identidad se confirmó mediante análisis de secuencias de ITS usando la herramienta de identificación TrichOKEY, versión 2.0 (www.isth.info).

[0051] SC1 de *T. atroviride* es capaz de utilizar un amplio intervalo de compuestos como únicas fuentes de carbono y de nitrógeno. El crecimiento fúngico en medio fue significativamente superior cuando se suministró con algunas fuentes de nitrógeno tales como extracto de levadura, nitrito, triptona, peptona, glutamina y asparagina o algunas fuentes de carbono tales como manosa, galactosa, sacarosa, extracto de malta, celobiosa, glucosa y trehalosa.

[0052] Sorbitol, lactosa, maltosa fructosa, arabinosa, xilosa y NH₄NO₃, KNO₃, NH₄Cl, serina, arginina y glutamina no promovieron el crecimiento de micelio.

[0053] Se probaron los efectos de las fuentes de nitrógeno (FN), NH₄NO₃, NH₄Cl, KNO₃, NaNO₃, NaNO₂, serina, arginina, glutamina, asparagina, triptona y peptona (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) y las fuentes de carbono (FC), sorbitol, lactosa, maltosa, fructosa, arabinosa, xilosa, trehalosa, glucosa, celobiosa, extracto de malta, sacarosa, galactosa y manosa (Sigma), sobre el peso seco micelial de SC1 de *T. atroviride*. Las FN y las FC se esterilizaron por filtración y se añadieron a una tasa de 2 g·l⁻¹ (FN) y 20 g·l⁻¹ (FC), a medio líquido Czapek Dox esterilizado en autoclave (Oxoid) modificado con glucosa (10 g·l⁻¹) (Sigma) o glicina (1 g·l⁻¹) (Sigma), cuando se prueban FN y FC, respectivamente. Los matraces que contienen 100 ml de cada medio nutritivo se inocularon cada uno con un tapón de agar de un cultivo de SC1 de *T. atroviride* de siete días de antigüedad. Después de una incubación de 13 días, los micelios se recogieron a través de un papel de filtro y se secaron, y sus pesos secos se midieron usando una balanza de humedad AMB110 (Adam Equipment, RU). Se inocularon cinco duplicados para cada tratamiento y se estudió el factor. El experimento se repitió dos veces.

[0054] Fue capaz de cultivarse SC1 de *T. atroviride* a temperaturas entre 10 °C y 30 °C. La temperatura óptima para el crecimiento fue 25 °C. A esta temperatura, la tasa de crecimiento fue significativamente mayor ($P \leq 0,05$) que a las otras temperaturas (Figura 1). Por tanto, el crecimiento óptimo se logró a 25 °C. Los primeros conidios se produjeron el tercer día después de la inoculación. El crecimiento radial fúngico a 20 °C no fue significativamente diferente del crecimiento observado a 25 °C. SC1 de *T. atroviride* no creció a temperaturas de 35 °C o superiores. Después de treinta días de incubación a 35 °C, el hongo se consideró muerto debido a que no fue capaz de crecer, incluso después de que la temperatura se redujera a la temperatura óptima de 25 °C. Temperaturas de -1 y 5 °C también inhibieron el crecimiento micelial. Sin embargo, después de 30 días a -1 °C y 5 °C, el hongo todavía fue capaz de crecer cuando se incubó de nuevo a 25 °C. La fase de latencia, con poco o ningún crecimiento observable, fue más larga a 10 °C (2 días) y 15 °C (3 días).

[0055] SC1 de *T. atroviride* es tolerante a un amplio intervalo de niveles de pH (Figura 2), con crecimiento óptimo observado sobre medio ácido (pH 4-6). El crecimiento micelar de SC1 de *T. atroviride* se redujo significativamente ($P \leq 0,05$) sobre medio alcalino (pH ≥ 8) y la esporulación se redujo a pH 3, además de valores de pH de 8 y por encima. La fase de latencia fue la misma (1 día) para todos los niveles de pH probados.

[0056] Las tasas de crecimiento también se influyeron por cambios en la actividad del agua (a_w), que es una medición del estado de energía del agua en un sistema, concretamente la presión de vapor del agua dividida entre la del agua pura a la misma temperatura (Figura 3). El mayor nivel de a_w probado (0,998) fue el nivel óptimo para el crecimiento fúngico. Cuando este parámetro disminuyó por debajo de 0,990, la tasa de crecimiento se redujo significativamente ($P \leq 0,05$) en comparación con la del medio de PDA no modificado ($a_w = 0,998$). Se observó crecimiento limitado a 0,910. La fase de latencia fue más larga cuando a_w disminuyó por debajo de 0,940 (2 días) y 0,910 (4 días).

25 Condiciones experimentales

[0057] Los efectos de la temperatura, pH y actividad del agua (a_w) sobre SC1 de *T. atroviride* se probaron en cultivos cultivados sobre placas de Petri de 90 mm que contenían PDA. Cada placa se inoculó con un disco de agar (5 mm de diámetro) recogido del borde de un cultivo de siete días de antigüedad. El disco del inóculo se colocó en el centro de cada placa. El crecimiento micelial se evaluó diariamente. Se inocularon diez placas por duplicado para cada nivel de los parámetros estudiados.

[0058] En el ensayo de temperatura, las placas se incubaron en la oscuridad a -1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37 y 40 °C, con un pH del medio de 5. En el ensayo de pH, los niveles de pH de los medios se ajustaron a 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 después de esterilizar en autoclave añadiendo disoluciones estériles de HCl 1 N o NaOH 2 N. Para probar el efecto de a_w , los medios se modificaron añadiendo cantidades crecientes de glicerol para obtener niveles de a_w de 0,990, 0,980, 0,960, 0,940 y 0,910. El pH del medio se ajustó a 4,5 con HCl 1 N o NaOH 2 N antes de esterilizar en autoclave. Los valores de a_w de todos los medios se midieron con un instrumento AquaLab serie 3 (Decagon, Pullman, Washington, EE.UU.). Para los ensayos de pH y a_w , las placas se incubaron en la oscuridad a 25 °C. Se evaluó el crecimiento radial el tercer día de incubación, que es aproximadamente el tiempo que necesita el hongo para colonizar completamente una placa de Petri de este tamaño bajo condiciones óptimas.

Ejemplo 2. Detección y cuantificación de SC1 de *T. atroviride*

[0059] La PCR en tiempo real usando los cebadores de *ech42* y *tga3* produjo productos de amplificación de todo el ADN de cepas de *Trichoderma* spp., otros hongos y muestras de tierra. Los productos dieron un único pico de fusión para cada gen, que indica que los cebadores solo amplificaron productos de *ech42* y *tga3*. En cambio, en presencia de la sonda TaqMan para *ech42* que contiene las dos mutaciones puntuales específicas de SC1 de la secuencia del gen *ech42*, solo SC1 de *T. atroviride* produjo una señal única y no se produjo hibridación de los productos de amplificación de sondas para otros hongos (incluidos la cepa F122 y SB18), muestras de vid y de tierra, confirmando la alta especificidad de la sonda para *ech42*. Un control interno (reacción de dúplex), que consiste en la sonda *tga3*, confirmó la exactitud del procedimiento produciendo una señal en los exámenes de PCR en tiempo real de todas las muestras de *Trichoderma* spp.

[0060] La amplificación del dúplex de la sonda TaqMan para *ech42* y *tga3* para la serie de concentraciones de ADN de SC1 de *T. atroviride* se produjo en el mismo umbral para cada concentración dada. Esto demostró que hay una única copia del amplicón de *ech42* en el genoma y una única copia del gen *Tga3*, y que estas dos secuencias tienen curvas patrón similares. Los resultados de los presentes inventores también mostraron que las reacciones de PCR para cada una de estas dos secuencias avanzaron con niveles de eficiencia similares (Figura 4).

[0061] Este procedimiento da un LOD de 5 copias del genoma por reacción de PCR. Para las muestras de tierra, el LOD calculado aumentó a 35 copias por mezcla de reacción, equivalente a $6,2 \times 10^3$ conidios por g de tierra, y LOQ osciló de 2×10^4 a 3×10^4 g de tierra⁻¹, el último delineado en la serie de tierras diferencialmente inoculadas (Tabla 2). El LOD absoluto oscila de $8,5 \times 10^3$ a $1,2 \times 10^4$ copias por reacción de PCR (Tabla 2).

[0062] La exactitud del procedimiento es muy alta a los cinco niveles de concentración de conidios probados (Figura 5) produciendo la cuantificación de SC1 de *T. atroviride* por el procedimiento molecular en cantidades comprendidas de 10^2 a 10^7 conidios·g⁻¹.

5 Condiciones experimentales

[0063] Cebadores de PCR en tiempo real y sonda: Se amplificó el gen endoquitinasa de SC1 de *T. atroviride* (*ech42*) (Carsolio y col., 1994) usando cebadores consenso basados en secuencias ya presentes en NCBI GeneBank. La secuencia completa obtenida se comparó y se alineó con 34 secuencias de la misma base de datos usando el programa BLAST (Altschul y col., 1997) y el programa ClustalW (disponible en el Instituto Europeo de Bioinformática, Laboratorio Europeo de Biología Molecular [<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>]), respectivamente. Se observaron varias diferencias en las secuencias de nucleótidos (en particular, se observaron dos desapareamientos de nucleótidos en el primer intrón de un cierto gen) y solo una secuencia en la base de datos (número de acceso GenBank NCBI AB041753.1 con referencia a SK-55 de *T. harzianum* aislado en Japón) fue idéntica a la cepa aislada de los presentes inventores. Por tanto, los cebadores de PCR en tiempo real y el conjunto de sondas TaqMan específico de la cepa (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) se diseñaron basándose en estos dos desapareamientos de nucleótidos sobre la hebra de 3' del gen *ech42*, usando el software Primer Express v2.0 (PE Applied Biosystems, Foster City, California) (Tabla 1). Se diseñaron un segundo conjunto de cebadores y la sonda TaqMan para el gen *tga3*, que codifica la subunidad α de la proteína G (Tabla 1).

[0064] PCR en tiempo real: Se realizaron reacciones en 20 μ l de volumen final que contiene: tampón IQ Multiplex Power Mix (Bio-Rad, Hercules; California), 0,3 μ M de cada uno de los cebadores de *ech42* y la sonda, sonda para *tga3* 0,4 μ M y 0,6 μ M de cada uno de los cebadores para *tga3*. Se realizó la PCR en tiempo real en un ciclador térmico MJ Chromo4 (MJ Research, Waltham, Massachusetts) usando el siguiente programa estándar: 2 min 30 s a 95 °C para el desnaturalizante inicial, 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 61 °C para una etapa de extensión en la que la señal de fluorescencia se midió y analizó por el software Opticon2 (MJ Research, Waltham, Massachusetts). Cuando las muestras se analizaron por química de SYBR Green I, se usó SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California), junto con 0,3 μ M del conjunto de cebadores para *ech42* y 0,3 μ M del conjunto de cebadores para *tga3*. Las condiciones de amplificación se cambiaron entonces a: un inicio caliente de 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 61 °C para la extensión, con una curva de fusión final de 40° a 90 °C, durante la cual las muestras se calentaron lentamente (0,5 °C cada 10 s).

[0065] La cuantificación de las muestras de ADN se hizo interpolando los valores del ciclo umbral (Ct) de la muestra con los valores de Ct de una curva de regresión estándar de concentraciones conocidas de ADN de SC1 de *T. atroviride* purificado previamente cuantificado usando el fluorímetro Qubit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California). La curva patrón se basó en ocho diluciones sucesivas de 1:3 de ADN genómico de SC1 y se incluyeron en cada ejecución de PCR. Las curvas resultantes tuvieron pendientes que oscilaron de 3,0 a 3,5, coeficientes de determinación superiores a 0,9 y 100 % de eficiencia de PCR. La cuantificación por SC1 se expresó como número de copias haploides del genoma, considerando que el tamaño del genoma de una única copia de *Trichoderma* es 0,034 pg.

[0066] Especificidad: La especificidad del procedimiento se probó sobre 50 cepas aisladas de *Trichoderma* spp. de colecciones de cultivos (26 cepas aisladas de CBS, una de ATCC, 13 de la Universidad de Pavia y dos de SafeCrop, concretamente F122 y SB18), dos cepas aisladas se usaron como biofungicidas comerciales (T39 de *T. harzianum* y T22 de *T. harzianum*) y seis cepas aisladas de *Trichoderma* de tierra recogida de un viñedo comercial en Italia del norte (coordenadas GIS: N46° 10,897' y OE11° 06,983'). Siete de las cepas aisladas examinadas se identificaron como *T. atroviride*. También se probó la especificidad sobre géneros fúngicos comúnmente presentes en tierras: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aureobasidium*, *Mucor*, *Gliocladium*, *Rhizopus*, *Acremonium*, *Coelomycetes*, *Geotricum*, *Plasmopara* y *Armillaria* de las colecciones SafeCrop (21) o CBS (1), o se aislaron (7) de tierras.

[0067] Todas las cepas aisladas fúngicas se cultivaron sobre agar de dextrosa de patata (PDA, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Se extrajo ADN directamente de 50-100 mg de micelios usando el minikit de plantas DNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania). La especificidad del procedimiento para SC1 de *T. atroviride* se probó comparando los productos de amplificación y las curvas de fusión obtenidas con las pruebas de SYBR Green I con aquellas obtenidas usando las sondas TaqMan específicas para *ech42* y *tga3*.

[0068] También se incluyeron diez muestras de tierras, cuatro de Trentino y seis de otras regiones italianas (Marche, Valle d'Aosta, Emilia-Romagna y Calabria) en la prueba de especificidad. El ADN, si no se indica de otro modo, se extrajo siempre de muestras de tierra de 200 mg secadas durante la noche, según el protocolo prescrito para el kit de aislamiento de ADN PowerSoil (Mo Bio, Carlsbad, California).

[0069] Se incluyó ADN de *Vitis vinifera* cv. Cabernet en la prueba de especificidad para controlar la amplificación de ADN a partir del material de raíz presente en tierras tratadas con SC1 de *T. atroviride*. Se extrajo ADN de plantas usando el minikit de plantas DNeasy (QIAGEN, Italia). En el análisis por RT-PCR del ADN genómico de SC1 de *T. atroviride*, los otros hongos y el ADN de vid usados como controles se cargaron a aproximadamente 0,2-1 ng,

mientras que 1-5 ng de ADN (la cantidad total extraída de cada muestra de tierra de 4 mg) se cargó en cada reacción de PCR.

5 **[0070]** Repetibilidad, precisión y sensibilidad: La repetibilidad del procedimiento de PCR en tiempo real se estimó para una suspensión de ADN puro de SC1 de *T. atroviride* y se extrajo ADN total de 7,5 g de tierra previamente inoculada con el hongo (10^7 conidios·g⁻¹) y se eluyó en 4 ml, siguiendo las instrucciones del fabricante para el kit de aislamiento de ADN PowerSoil Mega Prep (Mo Bio, Carlsbad, California). La precisión del procedimiento se estimó usando tierras que contenían diferentes concentraciones de **SC1** de *T. atroviride*. Para esta estimación, lotes de 50 g de tierra arenosa estéril tamizada se mezclaron con 10 ml de suspensiones de conidios de SC1 de *T. atroviride* para 10 alcanzar concentraciones finales de 10^7 , 10^6 , 10^4 y 10^2 conidios·g⁻¹ de tierra. Se extrajo ADN de tres muestras independientes para cada tratamiento de concentración, después de que las tierras se hubieran secado durante la noche a 60 °C (200 mg) y sus concentraciones de conidios respectivas se hubieran cuantificado en dos ejecuciones de PCR en tiempo real independientes.

15 **[0071]** La exactitud del procedimiento de cuantificación se calculó comparando copias del genoma estimadas con la concentración de conidios esperada.

20 **[0072]** Sensibilidad: La sensibilidad del procedimiento de PCR en tiempo real se definió por el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). El LOD se corresponde con el menor número de copias en la muestra para el que la desviación estándar bajo condiciones de repetibilidad es el 33 % o inferior. El LOQ se corresponde con el menor número de copias en la muestra para el que la desviación estándar bajo condiciones de repetibilidad es el 25 % o inferior. El LOD absoluto del procedimiento se calculó como el menor número de copias que deben estar presentes en la muestra para garantizar al menos el 95 % de exactitud.

25 Tabla 1 Cebadores y sondas de PCR en tiempo real diseñados para la detección y cuantificación de SC1 de *Trichoderma atroviride*. Los desapareamientos de bases en la sonda TaqMan para *ech42* están en negrita.

Cebadores y sondas	Secuencia (5'-3')	Producto amplificado (pb)
	Gen de endoquitinasa 42 (<i>ech42</i>)	
<i>Ech42</i> Dir	GTTCTGAGGCTGGAAGTTGC SEC ID N°: 1	112
<i>Ech42</i> Inv	ACGCCGTCTACTTCACCAAC SEC ID N°: 2	
<i>Ech42</i> P	6FAM-TACCCCTTCAATCACCAATTGTTAG-TAMRA SEC ID N°: 3	
	Gen de la subunidad α de la proteína G (<i>tga3</i>)	
<i>Tga3</i> Dir	TGTTGAAGCATTGGGTTTGA SEC ID N°: 4	132
<i>Tga3</i> Inv	TGATTGAGGTGACGTTCTCG SEC ID N°: 5	
<i>Tga3</i> P	HEX-AAGGAGTGAACGAAAGAAGTGGA-TAMRA SEC ID N°: 6	

30 Tabla 2. El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se determinaron usando la desviación estándar relativa (DER) del número de copias (NC) del genoma determinado a partir de las dos series de dilución de ADN puro de SC1 de *T. atroviride*, dos series de dilución de ADN total extraído de una muestra de tierra inoculada con $\log 10^7$ conidios g de tierra⁻¹ y análisis del ADN total extraído de una serie de tierras inoculadas con cantidades decrecientes de conidios. El LOD y el LOQ se fijaron al 33 % y 25 % de la desviación estándar relativa (DER), respectivamente. El LOD absoluto se corresponde con un nivel de detección de ADN del 95 %.

ADN	DER de la curva de regresión		LOD - LOQ		LOD absoluto	
	Ecuación	Coefficiente de determinación	NC PCR ⁻¹	NC g de tierra ⁻¹	NC PCR ⁻¹	NC g de tierra ⁻¹
SC1 1	Y=0,4304x ^{-0,1579}	0,9874	5-31	-	8	nd
SC1 2	Y=0,369x ^{-0,1359}	0,9475	3-17	-	15	nd
SC1 + tierra 1	Y=0,8811x ^{-0,2696}	0,9711	38 - 106	0,7×10 ⁴ -1,9×10 ⁴	60	1,1×10 ⁴
SC1 + tierra 2	Y=0,6821x ^{-0,2089}	0,9459	32-122	0,6×10 ⁴ -2,2×10 ⁴	35	0,6×10 ⁴
Serie de SC1 en tierra ^z	Y=313,01x ^{-1,677}	0,9929	26 - 130	0,7×10 ⁴ -3,4×10 ⁴	48	1,2×10 ⁴

^z Curva de regresión de DER calculada basándose en cuatro concentraciones de conidios.

35 Ejemplo 3. Procedimientos para la producción y para el tratamiento

[0073] Se cultivó satisfactoriamente SC1 de *T. atroviride* sobre varios medios de laboratorio comunes como agar de dextrosa de patata, caldo nutritivo, agar de extracto de malta.

40 **[0074]** Se aplicó con uno de los tres siguientes procedimientos conocidos: crecimiento en caldo de cultivo, sobre arroz o sobre cortezas/turba.

[0075] Los tres procedimientos proporcionaron el 99 % de propágulos viables de SC1 de *T. atroviride*.

[0076] SC1 de *T. atroviride* producida sobre arroz o cultivado sobre cortezas sobrevive durante al menos un año a 15 °C al 98 % de HR. SC1 de *T. atroviride* se cultivó sobre abonos vegetales o cortezas. Se observaron diferencias con otras cepas de *T. atroviride*, en particular F122 de *T. atroviride* no sobrevivió sobre cortezas o turba a las condiciones anteriormente mencionadas.

5

Condiciones experimentales

[0077] La preparación de la composición agrícola se llevó a cabo según uno de los siguientes procedimientos:

- 10 a) La inoculación con micelio de SC1 de *T. atroviride* o conidios (al menos 10^2 conidios/l) de caldo de cultivo (caldo nutritivo o caldo de extracto de malta) e incubación bajo agitación continua se llevó a cabo a una temperatura entre 20 y 25 °C, durante al menos 48 h. El caldo de cultivo filtrado o no filtrado se pulverizó a las plantas o se incorporó en la tierra.
- 15 b) Se inoculó arroz hervido esterilizado (o cereal equivalente) con conidios, micelio de SC1 de *T. atroviride* o conidios (al menos 10^2 conidios/100 g) y se incubó durante 21 días a 25 °C. Para tratamientos de tierra, se mezcló SC1 de *T. atroviride* de arroz a la tierra para tener una dosis de inóculo de 1×10^6 UFC·g⁻¹ de tierra en los primeros 3 cm de tierra. Para los tratamientos foliares, se recogieron conidios de SC1 de *T. atroviride* de arroz lavando con agua y se aplicaron con o sin la adición de otros adyuvantes de pulverización (agentes humectantes, emulsionantes, etc.);
- 20 c) Se cultivó SC1 de *T. atroviride* sobre trozos de corteza preventivamente tratados o no con un medio microbiológico de crecimiento (caldo nutritivo) o sustancias nutritivas que contenían fuentes de carbono y de nitrógeno (arroz molido). Las cortezas se inocularon con SC1 de *T. atroviride* (al menos 10^2 conidios/100 g), se incubaron durante al menos dos días o hasta la colonización a 20-25 °C. Pueden usarse cortezas inoculadas como abono en cualquier momento del cultivo de plantas que proporciona control del patógeno transmitido por
- 25 la tierra existente o para prevenir nuevas infecciones. Se inocularon abonos vegetales (turba) sin sustancias nutritivas como se hizo para cortezas.

Ejemplo 4. Supervivencia de SC1 de *T. atroviride* sobre el filoplano de fresa

- 30 **[0078]** Las densidades de población de conidios de SC1 de *T. atroviride* viables sobre el filoplano de la fresa disminuyeron rápidamente durante la primera semana después de la inoculación. La población fúngica mostró una disminución continua hasta el 15º día después de la aplicación, después de lo cual se mantuvo una baja concentración de UFC hasta el día 45º cuando el experimento se concluyó (Figura 6). SC1 de *T. atroviride* no produjo fitotoxicidad ni es patógeno para las hojas, flores o frutos de la fresa y sobrevivió durante más de un mes
- 35 sobre las hojas de la fresa.

Condiciones experimentales

- 40 **[0079]** Se obtuvieron suspensiones de conidio de SC1 de *T. atroviride* lavando cultivos de 21 días de antigüedad cultivados sobre arroz hervido con 0,01 % de Tween 80 (Sigma) en agua destilada estéril (SDW). La suspensión conidial se filtró a través de tres capas de tejido de lente estéril para eliminar los fragmentos micelares. La concentración conidial se determinó usando un hemocitómetro Thomas y se ajustó a una concentración de 10^6 conidios·ml⁻¹. La concentración de conidios viables en el inóculo se determinó contando las unidades formadoras de colonias (UFC) en una dilución sucesiva sobre PDA modificado con 2 ml·l⁻¹ de Triton X-100 (Sigma). Las colonias se
- 45 contaron tras la incubación de los cultivos a 25 °C durante siete días.

- [0080]** Hojas de 10 plantas de fresa mantenidas bajo condiciones de invernadero controladas (25 ± 2 °C, HR = 60 ± 10 %) se pulverizaron uniformemente con el inóculo de SC1 de *T. atroviride* usando un pulverizador manual. Se arrancó aleatoriamente una hoja seleccionada de cada planta 0, 1, 3, 7, 15, 30 y 45 días después de la inoculación. Se cortó un disco de hoja (25 mm de diámetro) de cada hoja usando un sacabocados estéril. Los discos se transfirieron a tubos Falcon que contenían 5 ml de Tween 80 (0,01 %), se agitaron durante 4 min y luego se dejaron reposar durante 1 min. Se sembró una serie de dilución en SDW en placa sobre un medio semi-selectivo que consistió en PDA modificado con rosa de Bengala (100 ppm), estreptomycin (100 ppm) y cloranfenicol (50 ppm) para minimizar la presencia de bacterias. Se contaron UFC sobre las diluciones apropiadas y los resultados se expresaron como UFC·mm⁻² de hoja. Las cifras de UFC de las placas de dilución se convirtieron en UFC por mm⁻² de hoja. Este experimento se realizó dos veces y no se observó diferencia experimental significativa entre los dos experimentos.

Ejemplo 5. Supervivencia de SC1 de *T. atroviride* en tierra

- 60 **[0081]** SC1 de *T. atroviride* fue capaz de sobrevivir en al menos tres tipos diferentes de tierras. Después de su introducción en las tierras, SC1 de *T. atroviride* sobrevivió hasta el final del experimento (45 días), como se indica por su recuperación sobre placas de dilución de las tierras estériles y no estériles como se muestra en la Figura 7. Las diferentes características de la tierra también influyeron en la supervivencia fúngica. Los resultados obtenidos para las tierras de marga arenosas (2 y 3) con altos niveles de materia orgánica fueron similares entre sí, pero diferentes de los resultados obtenidos para la marga de arcilla (Tierra 1), que también tuvo menos materia orgánica.
- 65

[0082] La esterilización de la tierra en autoclave se asoció a mayor supervivencia de SC1 de *T. atroviride*. En las tierras estériles, la concentración fúngica aumentó casi un orden de magnitud en el tercer día, alcanzando una concentración máxima de 10^7 UFC·g⁻¹ de tierra seca en la Tierra 1 estéril, y un poco menos en las Tierras 2 y 3. Después de eso, la concentración de *T. atroviride* permaneció entre 10^6 y 10^7 UFC·g⁻¹ de tierra seca hasta 45 días después de la inoculación (Figura 7a) en todos los tipos de tierra. Las concentraciones fúngicas finales en la tierra esterilizada fueron significativamente mayores ($P \leq 0,05$) para las Tierras 2 y 3 que para la Tierra 1. Hubo diferencias significativas entre los valores de UFC para los tratamientos estériles y no estériles para cada tipo de tierra en cada fecha de evaluación, excepto para la Tierra 1 30 días después de la inoculación. Los valores de UFC de SC1 de *T. atroviride* aumentaron en tierra esterilizada. Los valores de UFC en Tierra 2 no estériles fueron similares a aquellos de Tierra 3 no estériles. En la Tierra 1 no tratada, hubo un pequeño aumento en el número de UFC un día después de la inoculación, pero la concentración de conidios al final del experimento en todos los tipos de tierra fue inferior a la del inóculo inicial. La concentración de conidios final (UFC) en tierras no tratadas fue significativamente mayor ($P \leq 0,05$) para la Tierra 1 que las Tierras 2 y 3. El efecto de la esterilización de la tierra sobre la supervivencia de SC1 de *T. atroviride* fue más pronunciado en las Tierras 2 y 3 que en la Tierra 1.

[0083] En el microcosmos no tratado (no inoculado) usado como control, se detectó un nivel muy bajo de *Trichoderma* spp. nativa (1 a $3 \cdot 10^2$ UFC·g⁻¹), pero ninguna de las UFC se identificaron como *T. atroviride*.

Condiciones experimentales

[0084] El ensayo de supervivencia en la tierra se basó en el procedimiento descrito por Bennett y col. (2003), con algunas modificaciones. Se usaron tres tipos de tierra de Italia del norte (región de Trentino) con diferentes características físicas y químicas (Tabla 1). La tierra se secó a temperatura ambiente y se tamizó (malla < 2 mm). La tierra tamizada (100 g) se colocó en botellas de polipropileno de 500 ml y las muestras se dejaron sin tratar (no estériles) a temperatura ambiente o se esterilizaron en autoclave (121 °C durante 30 min) dos veces en días consecutivos (estériles).

[0085] El inóculo se preparó como se ha descrito antes. El experimento se realizó bajo condiciones estériles. Se añadieron conidios a la tierra para conseguir una concentración final de 10^6 conidios·g⁻¹ de tierra y se mezclaron con una espátula estéril. Las botellas se incubaron a temperatura ambiente. Se establecieron cinco duplicados para cada combinación de tipo de tierra X tratamiento de la tierra (no estéril y estéril).

[0086] Se sacó asepticamente una submuestra de tierra (1 g) de cada botella de muestra usando una cuchara de muestra estéril (PBI International, Whitstable, RU) y se colocó en 10 ml de 0,01 % de Tween 80, se agitó durante 4 min y se dejó reposar durante 1 min. Se estableció una serie de dilución y se sembró sobre el medio semi-selectivo como se ha descrito anteriormente. Las UFC se contaron sobre las placas de dilución apropiadas después de siete días de incubación a 25 °C y se expresaron como UFC·g⁻¹ de tierra seca. Las evaluaciones de UFC en las muestras de tierra se llevaron a cabo inmediatamente después de la inoculación y 1, 5, 10, 20, 30 y 45 días después de la inoculación. Las cifras de UFC de las placas de dilución se expresaron como UFC por gramo de tierra seca (UFC·g⁻¹).

Ejemplo 6. Supervivencia de SC1 de *T. atroviride* en una tierra de viñedo

[0087] También se comprobó la supervivencia en tierra en un viñedo comercial durante un año entero. El experimento se repitió dos veces.

[0088] SC1 de *T. atroviride* pudo sobrevivir a alta concentración de conidios (10^8 UFC·g de tierra seca⁻¹) sobre la primera capa de tierra (superficie de la tierra) durante un largo tiempo (al menos 18 semanas después del tratamiento) en ambos años. SC1 de *T. atroviride* migra verticalmente en la tierra muy rápidamente después del tratamiento (una semana) alcanzando una profundidad de 0,4 m. Entonces, la concentración de UFC mantuvo valores estables durante dos años hasta la evaluación en la 18ª semana. Estuvo presente un gradiente en densidades de población en ambos años de las capas de tierra de la superficie a las profundas. El mayor número de UFC detectadas fue 10^5 UFC·g de tierra seca⁻¹ a 0,1 m de profundidad de la tierra, aproximadamente 10^4 a 0,2 m y 10^3 UFC·g de tierra seca⁻¹ a 0,3 y 0,4 m. Diferencias en la dinámica de población entre los dos años estuvieron presentes solo en la concentración de UFC en la superficie de la tierra cinco y nueve semanas después del tratamiento significativamente diferente (prueba de Tukey; $\alpha = 0,05$). En particular, después de 9 semanas, las UFC de SC1 de *T. atroviride* sobre la superficie de la tierra aumentaron incluso más de la concentración inicial de inóculo (10^9 UFC·g de tierra seca⁻¹), después de una disminución inicial en la 5ª semana. Un año después de la inoculación de la tierra, se detectó SC1 de *T. atroviride* a una concentración de 10^2 - 10^3 UFC·g de tierra seca⁻¹ para ambos experimentos a concentración comparable a *Trichoderma* spp. indígena sobre el área tratada. El procedimiento de PCR en tiempo real confirmó la ausencia de la cepa antes de su introducción en la tierra y la persistencia de la cepa en las capas de tierra.

[0089] La relación lineal ($y = 0,8472x + 0,1105$, $R^2 = 0,6794$) entre los resultados obtenidos con los dos procedimientos (recuento de UFC y procedimiento molecular) confirma la eficiencia de la detección molecular de SC1 de *T. atroviride*.

5 **[0090]** Después de 9 semanas de su liberación en la tierra, se encontró SC1 de *T. atroviride* a una distancia de 0,5 y 2 m de los hoyos tratados en la superficie de la tierra, a 0,1 m y 0,3 m de profundidad de la tierra. La UFC fue significativamente mayor (prueba de Tukey; $\alpha = 0,05$) que la población de *Trichoderma spp.* indígena aislada en el área no tratada, en la superficie de la tierra, a 0,5 y 2 m de los hoyos tratados y a 10 cm de profundidad de la tierra a 0,5 m de distancia de los hoyos tratados. La concentración de conidios de SC1 en las otras capas de tierra a 0,5 y 2 m de distancia de los hoyos tratados no fue significativamente mayor (prueba de Tukey; $\alpha = 0,05$) que la población de *Trichoderma spp.* indígena aislada en el área no tratada. La frecuencia de manifestación de SC1 de *T. atroviride* fue alta (respectivamente del 100 % a 0,5 m de los hoyos tratados en toda la profundidad de la tierra) y disminuyó al 90, 70 y 30 % a 2 m de distancia de los hoyos tratados respectivamente en la superficie de la tierra, a 0,1 y 0,3 m de profundidad de la tierra.

15 **[0091]** Dieciocho semanas después de su introducción en la tierra, todavía era posible recuperar SC1 de *T. atroviride* en la superficie de la tierra tanto a 2 como 4 m de distancia de los hoyos tratados. Estas concentraciones de UFC no fueron significativamente diferentes (prueba de Tukey; $\alpha = 0,05$) en comparación con la concentración de conidios de *Trichoderma spp.* indígena obtenida del área no tratada. Aunque se detectaron bajas concentraciones después de 18 semanas, la frecuencia de manifestación de SC1 de *T. atroviride* fue alta (respectivamente del 80 y 70 % a 2 y 4 m de los hoyos tratados).

20 **[0092]** Se encontró SC1 de *T. atroviride* sobre las hojas de vides plantadas en la tierra tratada. El número de UFC de SC1 de *T. atroviride* por mm^2 de hoja⁻¹ fue significativamente mayor (prueba de Tukey; $\alpha = 0,05$) sobre las hojas de plantas en tierra tratada que *Trichoderma spp.* indígena aislada sobre las plantas en las áreas no tratadas. Hubo una diferencia significativa (prueba de Tukey; $\alpha = 0,05$) en las UFC de SC1 de *T. atroviride* por unidad de superficie (mm^2) entre las hojas superiores e inferiores de las plantas en áreas tratadas.

25 **[0093]** Dieciocho semanas después de sembrar en los hoyos tratados, la concentración de SC1 de *T. atroviride* en la rizoesfera de vid fue 10^7 UFC·g de tierra seca.

30 **[0094]** Números de hojas, números de brotes, peso de raíz seca, longitud del tallo y longitud total de las plantas de vid no demostraron diferencias significativas entre vides plantadas en tierra no tratada o tratada con SC1 de *T. atroviride* (prueba de Tukey; $\alpha = 0,05$, datos no mostrados), que indica que el hongo no es patógeno para el cultivo de vid.

35 **[0095]** El aislamiento de SC1 de *T. atroviride* un año después de la inoculación indica que puede tolerar bajas temperaturas del invierno y fluctuaciones de humedad en la tierra. La concentración de SC1 de *T. atroviride* en la tierra un año después de la inoculación similar a *Trichoderma spp.* indígena indica que puede establecerse en la tierra.

40 **[0096]** Se llevaron a cabo las mismas pruebas en 2006 con una cepa diferente, F122 de *T. atroviride*. Esta cepa se detectó solo hasta 18 semanas después de la inoculación y no se detectó un año después de la inoculación. La incapacidad de supervivencia de F122 de *T. atroviride* en condiciones de crecimiento comparables un año después de las inoculaciones demuestran la superioridad de SC1 de *T. atroviride* con respecto a otras cepas.

Condiciones experimentales

45 **[0097]** En todos los experimentos, la concentración de SC1 de *T. atroviride* viable se estimó recogiendo 1 g de muestras de tierra de cada terreno, colocando cada muestra en 10 ml de agua estéril y a continuación sembrando 1 ml de esta suspensión, después de diluciones sucesivas de 10 veces, sobre medio semi-selectivo. Se contaron colonias fúngicas después de siete días de incubación y los números de poblaciones estuvieron presentes en términos de \log UFC·g de tierra seca⁻¹. El peso seco de la tierra se estimó después de la incubación de la muestra (o sub-muestra) a 60 °C durante 48 h. Los conidios sobre el arroz usados como inóculo siempre tuvieron una estrecha viabilidad promedio al 100 %. Se distinguieron colonias de SC1 de *T. atroviride* de otras especies de *Trichoderma* por sus micelios aéreos característicos (primero blancos, luego se volvieron rápidamente de verde amarillento a verde oliva). Para la identificación inequívoca de las cepas aisladas de los presentes inventores, la identidad de casi el 10 % de las colonias de cada placa que se había identificado morfológicamente como *T. atroviride* se confirmó por análisis por PCR usando cebadores y un conjunto de sondas Taq-Man basado en una mutación de bases del gen endoquitinasa (*Ech42*) que es específico para SC1 de *T. atroviride* (como en el Ejemplo 2). Los experimentos consistieron en seis representaciones de 0,6 x 0,6 m cada una, que se localizaron entre plantas de vid en la hilera en el viñedo. Se inocularon tres terrenos con SC1 de *T. atroviride* y cada uno recibió 500 g del medio de arroz hervido con el hongo cultivado sobre él. El inóculo se mezcló en la superficie de la capa de tierra (aproximadamente 30 mm de profundidad). Se estimó que la concentración inicial del inóculo fúngico en esta capa era 10^8 UFC·g de tierra seca⁻¹. Se usaron tres terrenos no inoculados adicionales como control no tratado. En cada terreno, la tierra se muestreó excavando la parte externa de un lado del terreno y exponiendo el perfil de tierra. El muestreo se hizo recogiendo tres zanahorias transversales de tierra (50 ml, 300 mm de diámetro) a diferentes profundidades (sobre la superficie y a 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 m) y momentos de tiempo (en el momento de la inoculación y 1, 5, 9 y 18 semanas después de la inoculación con SC1 de *T. atroviride*). Se hizo un muestreo de tierra adicional un año después de la

inoculación del primer experimento.

[0098] Se extrajo una sub-muestra de tierra (1 g) de cada muestra usando una cuchara estéril. La sub-muestra de tierra se colocó en 10 ml de 0,01 % de Tween 80 (Acros Organics, Geel, Bélgica), se agitó durante 4 min usando un vórtex (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania) y se dejó reposar durante 1 min. Se estableció una serie de diluciones en agua destilada estéril y las suspensiones diluidas se sembraron sobre placas de Petri que contenían los medios semi-selectivos. A continuación, estas placas de Petri se incubaron a 25 °C y las cifras de colonias finales se hicieron sobre los cultivos correspondientes a las diluciones apropiadas (UFC dentro del intervalo de 30-300 colonias por placa) después de cinco días de incubación. Hubo tres duplicados para cada muestra de tierra. Los resultados se expresaron como UFC·g de tierra seca⁻¹. Las identidades de colonias de SC1 de *T. atroviride* se confirmaron como se describe en el número de ejemplo.

[0099] Se usó PCR en tiempo real para determinar los números de copias de SC1 de *T. atroviride* del genoma (CN) en todas las muestras de 2006. Para el análisis por RT-PCR, se recogieron dos sub-muestras independientes para cada combinación de profundidad y tiempo y la extracción de ADN y análisis por PCR en tiempo real de cada muestra se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 2.

[0100] La dispersión de conidios de SC1 de *T. atroviride* se examinó en 2006. Se cavaron hoyos que miden 0,3 × 0,3 × 0,3 m en la hilera del viñedo entre las plantas de vid. Se rellenaron diez hoyos con una mezcla de la tierra cavada e inóculo de *T. atroviride* (400 g·hoyo⁻¹). La concentración inicial de inóculo fúngico fue 10⁶ UFC·g de tierra seca⁻¹. Los otros diez hoyos se volvieron a llenar con la tierra cavada no tratada. Se plantó una planta de vid de un año de edad (Pinot gris sobre Kober 5BB) en cada hoyo.

[0101] Se recogieron dos conjuntos de muestras de tierra. El primer muestreo se llevó a cabo nueve semanas después de la inoculación en tanto los hoyos tratados como no tratados (0 m) y a distancias horizontales de 0,5 y 2,0 m del hoyo. A cada una de estas distancias, se recogieron muestras de tierra a tres profundidades de la tierra (0, 0,1 y 0,3 m). Se realizó un segundo muestreo 18 semanas después de la inoculación y, en ese momento, se recogieron muestras de tierra solo sobre la superficie (primeros 30 mm de tierra) de los hoyos y a distancias horizontales de 2,0 y 4,0 m de los sitios de inoculación. Se recogieron muestras y el número de UFC en cada muestra se determinó como se ha descrito previamente. La dispersión se evaluó en términos de concentración de SC1 de *T. atroviride* (UFC·g de tierra seca⁻¹) y frecuencia (porcentaje de muestras de tierra con al menos una UFC).

[0102] La migración de SC1 de *T. atroviride* de la tierra a las hojas de las vides se evaluó 10 semanas después de la inoculación de la tierra. Se arrancaron tres hojas apicales y tres hojas de la parte inferior de cada planta (cada planta tuvo un promedio de 15 hojas) que creció en los hoyos tratados y no tratados. Cada hoja recién recogida se transfirió a un tubo Falcon que contenía 30 ml de agua destilada estéril más 0,01 % de Tween 80. Estos tubos se agitaron durante 3 minutos y a continuación se transfirió 1 ml de cada una de las suspensiones resultantes a una placa de Petri que contenía el medio semi-selectivo. Se contaron UFC tras siete días de incubación a 25 °C. El área de la hoja se calculó usando un programa de procesamiento y análisis de imágenes, Imagen Tool versión 2.0 (UTHSCSA, San Antonio, TX, EE.UU.). Al final del experimento, las plantas se sacaron de la tierra. La tierra que no se adhirió firmemente a las raíces se retiró cuidadosamente sacudiendo ligeramente y a continuación las raíces se sacudieron vigorosamente en una bolsa de plástico para mover la tierra de la rizoesfera. El muestreo de la tierra de la rizoesfera y el recuento de UFC para estas muestras (sub-muestras de 1 g; tres duplicados) se hizo como se ha descrito previamente.

[0103] Para evaluar la influencia de SC1 de *T. atroviride* sobre el crecimiento de la planta, se hicieron mediciones de longitud total, longitud del tallo y los números de hojas y tallos para cada planta en las áreas tratadas y no tratadas en la novena y 18^a semanas después de la inoculación de la tierra. El peso seco de la raíz también se determinó para cada planta al final del experimento (18^a semana después de la inoculación).

Ejemplo 7. Actividad de biocontrol *in vitro*

[0104] En el bioensayo de cultivo dual, SC1 de *T. atroviride* inhibió completamente *B. cinerea* y *A. mellea* con una eficacia antagonista del 100%.

Condiciones experimentales

[0105] Se probó el agonismo de SC1 de *T. atroviride in vitro* para un patógeno foliar y de los frutos (*Botrytis cinerea*) y transmitido por la tierra (*Armillaria mellea*) usando el procedimiento de cultivo dual del siguiente modo: los patógenos (*B. cinerea* o *A. mellea*) se inocularon a la distancia de 2 cm (A) de SC1 de *T. atroviride* (B) sobre PDA de placas de Petri (90 mm de diámetro). *B. cinerea*, *A. mellea* y SC1 de *T. atroviride* se cultivaron cada uno solo como controles no tratados. Hubo al menos tres duplicados de cada combinación. La eficacia antagonista se calculó después de una semana de incubación a 20 °C, como (AD-AC) × 100/AD, en la que AC y AD son el crecimiento radial del patógeno con y sin SC1 de *T. atroviride*, respectivamente.

Ejemplo 8. Biocontrol de oídios

[0106] SC1 de *T. atroviride* controla oídio (*Podosphaera xanthii*) sobre cultivos hortícolas como pepino y calabacín al mismo nivel del azufre, que es uno de los fungicidas químicos más ampliamente usados y que, por tanto, se incluyó como patrón (Figura 8). En particular se observa que SC1 de *T. atroviride* controla la enfermedad al mismo nivel que el azufre y mejor que las dos cepas de *Trichoderma* usadas como patrones. Por tanto, en calabacín estuvo presente la eficacia de biocontrol (diferencia significativa con no tratado).

Condiciones experimentales

[0107] Se usaron plantas con al menos cinco hojas bien ensanchadas de cultivares susceptibles. Los cultivares usados fueron Afrodite o Xara para calabacín y 807 para pepino. Se plantaron semillas en turba: mezcla para macetas de grava volcánica (1:1) en macetas de un litro y se cultivaron en un invernadero sin CPM mantenido a 20-30 °C con un fotoperiodo natural. Hubo de cinco a seis duplicados (macetas) de cada tratamiento y cultivo. El inóculo de *P. xanthii* se recogió inicialmente en invernaderos comerciales sobre plantas de calabacín y pepino naturalmente infectadas y después se mantuvo sobre plantas de pepino y calabacín infectando plantas de 3 semanas de edad y manteniendo las plantas infectadas durante hasta un mes en un compartimento separado del invernadero. Se obtuvieron conidios lavando con agua las hojas que poseen carne y nuevo micelio de conidiación e inmediatamente se pulverizaron sobre plantas. La concentración de inóculo fue aprox. 10^7 conidios·ml⁻¹ y se aplicó un volumen de 5 ml·planta⁻¹. Una vez secas, las plantas se incubaron durante la noche a 22 °C y alta humedad relativa (HR >95 %). Después de la inoculación artificial, las condiciones de día-tiempo fueron 20-30 °C con 30-70 % de HR y las condiciones de noche-tiempo fueron 15-20 °C con 85-90 % de HR. Las plantas se dispusieron en bloques completamente al azar.

[0108] Se cultivó SC1 de *T. atroviride* en caldo nutritivo (procedimiento a), Ejemplo 3) y se pulverizó con un pulverizador manual sobre hojas. También se incluyeron un control no tratado, azufre (Tiovit, Syngenta Crop Protection) y un agente de biocontrol comercial (T39 de *Trichoderma harzianum*, Trichodex®), Intrachem bio) en el experimento. Para cada tratamiento se pulverizaron 5 ml de disolución·planta⁻¹ para la planta. Los experimentos se repitieron al menos dos veces. Se dispusieron SC1 de *T. atroviride* y control en un bloque completamente al azar. Empezando siete días después de la inoculación, las hojas se comprobaron semanalmente para síntomas de oídio. Cuando estuvo presente, se puntuó la gravedad de la enfermedad. La gravedad de la enfermedad se midió como el porcentaje de área de la hoja sintomática sobre todas las hojas.

[0109] Se usó análisis de la varianza (ANOVA) para analizar el arcsen de datos transformados y normalizados. Este análisis se realizó usando Statistica, versión 7 (StatSoft, Tulsa, OK, EE.UU.). Las medias se separaron según la prueba de HSD de Tukey ($\alpha = 0,05$). Se usó la prueba no paramétrica de Kursal-Paredis cuando no se cumplieron las condiciones para la ANOVA.

Ejemplo 9. Biocontrol de agentes de enfermedades de la madera (enfermedad de Esca)

[0110] SC1 de *T. atroviride* controla los tres patógenos principales de la enfermedad de Esca. La eficacia de control de *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Fomitiporia mediterranea* es muy alta y próxima al 100 % (Figura 9). Las gráficas representan el promedio de cinco duplicados (placas de Petri). La eficacia de control de SC1 de *T. atroviride* fue siempre mejor que la del agente de biocontrol usado como patrón (F77 de *Bacillus subtilis*).

Condiciones experimentales

[0111] Cada uno de los tres patógenos mencionados anteriormente se inoculó sobre PDA en placas de Petri de 3 cm desde el borde y se incubaron durante una semana a 25 °C. Entonces se inoculó SC1 de *T. atroviride* sobre el sitio opuesto, a una distancia de 3 cm desde el borde. Se hicieron cinco duplicados para cada patógeno y para el control no tratado.

[0112] El crecimiento de micelio se midió 2, 4, 9, 14, 19, 24 y 29 días después del tratamiento, en particular C es el crecimiento en el no tratado (mm) y T el crecimiento sobre el tratado con SC1 de *T. atroviride* (mm). La eficacia se calculó con la siguiente fórmula [(C-T)/C]x100 (Sivakumar y col., 2000).

Ejemplo 10. Biocontrol de podredumbres de la raíz

[0113] *Armillaria mellea* y *A. gallica* son los principales agentes causantes de las podredumbres de la raíz en varios cultivos. SC1 de *T. atroviride* es eficaz contra estos dos patógenos y también es más eficaz que T39 de *T. harzianum* como agente de biocontrol estándar. Se redujo el crecimiento de los patógenos y con el tiempo se destruyeron. Esto es evidente en el experimento de condiciones controladas contra los dos patógenos cultivados sobre trozos de madera mostrados en la Figura 10, en el que se ha comparado el crecimiento micelar de *Armillaria mellea* y *Armillaria gallica* (agentes causales de la podredumbre de la raíz) en presencia de SC1 de *Trichoderma atroviride* o en su ausencia. El efecto experimental de T39 de *Trichoderma harzianum* - nombre comercial

Trichodex® - se muestra aquí para comparación. El crecimiento se expresa como promedio del diámetro de cinco duplicados cultivados sobre trozos de madera sobre PDA sobre placas de Petri a 20 °C.

5 **[0114]** SC1 de *T. atroviride* también puede prevenir infecciones sobre plantas. En realidad, el porcentaje de plantas muertas (infectadas) se evaluó después de 6 meses desde la primera aplicación, que es cuando los síntomas de enfermedades fueron visibles y se encontró que SC1 de *T. atroviride* protegió las plantas de fresa de *A. mellea* (60 % de protección) y *A. gallica* (100 % de protección). En cambio, F122 de *T. atroviride* solo dio el 20 % de protección y T39 de *T. harzianum* solo el 13 % contra la enfermedad (los valores en las Figuras 10 y 11 son porcentajes calculados sobre 10 plantas duplicadas). En el caso de plantas de fresa se redujo significativamente la enfermedad producida por *A. mellea* y *A. gallica* incluso después de 6 meses desde la aplicación.

[0115] Se usó F122 de *T. atroviride* como comparación para *A. mellea* (Fig. 11) y se encontró que mostraba una actividad significativamente menor que la cepa de SC1.

15 **Condiciones experimentales**

[0116] Se inocularon *A. mellea* y *A. gallica* sobre trozos de madera colocados sobre PDA en placas de Petri sobre un lado del trozo de madera y se incubaron durante una semana a 25 °C. Entonces, SC1 de *T. atroviride* se inoculó sobre el sitio opuesto. Se hicieron cinco duplicados para cada patógeno y para el control no tratado. El crecimiento del micelio se midió semanalmente después del tratamiento durante 6 semanas.

20 **[0117]** Se inocularon plantas de fresa (Elsanta cv) poniendo tres trozos de madera infectados con *A. mellea* o *A. gallica* cerca de la corona de las plantas. Se trataron plantas con SC1 de *T. atroviride* cultivadas con el procedimiento b) (véase el Ejemplo 3) y alternativamente se usó el procedimiento c) como se describe en el Ejemplo 3 para el mismo fin para proteger aquellas plantas que necesitan altos niveles de materia orgánica como plantas de arándano que dan los mismos resultados obtenidos con plantas de fresa como se muestra en la Figura 11. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones controladas de invernadero.

30 **Referencias**

[0118]

- Altschul SF, Madden TL., Shaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J. 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 25:3389-3402.
- 35 Bennett AJ, Leifert C, Whipps JM. 2003 Survival of the biocontrol agents *Coniothyrium minitans* and *Bacillus subtilis* MBI 600 introduced into pasteurised, sterilised and non-sterile soils. *Soil Biol Biochem*; 35: 1565-1573
- Carsolio C, Gutierrez A, Jimenez B, Van Montagu M, Herrera-Estrella A. 1994. Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *PNAS USA*; 91:10903-10907.
- 40 Elad Y. *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant disease- control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium flavum*. *Biocontrol Sci Techn* 2000; 10: 499-507.
- Harman GE. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis* 2000; 84(4): 377-393. Klein D, Eveleigh E. 1998 Ecology of *Trichoderma*. In: Harman GE, Kubicek CP, eds. *Trichoderma & Gliocladium*, vol. 1. Taylor & Francis, Padstow, UK: 57-74.
- 45 Kredics L, Anthal Z, Manczinger L. 2000 Influence of water potential on growth, enzyme secretion and in vitro enzyme activities of *Trichoderma harzianum* at different temperatures. *Curr Microbiol*; 40: 310-314.
- Kredics L, Manczinger L, Anthal Z, Péntzes Z, Szekeres A, Kevei F, Nagy E. 2004 In vitro activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *J Appl Microbiol*; 96: 491-498.
- 50 Longa C. 2007 Fungal biocontrol agents: identification and fate of *Trichoderma atroviride* P. Karst. in the environment. PhD thesis.
- Paulitz TC. 2000 Population dynamics of biocontrol agents and pathogens in soil and rhizospheres. *Eur J Plant Pathol*; 106: 401-413.
- Sivakumar D, Wilson Wijeratnam RS, Wijesundera, RLC, Marikar FMT, Abeyesekere M.. 2000 Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Phytoparasitica*; 28: (3), pp. 240-247.
- 55 Spencer DM 1978 *The Powdery Mildews*. Academic Press, New York, USA.

LISTADO DE SECUENCIAS

60 **[0119]**

<110> TRENTINO SVILUPPO S.p.A. FONDAZIONE EDMUND MACH

65 <120> SC1 DE *TRICHODERMA ATROVIRIDE* PARA EL BIOCONTROL DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN PLANTAS

ES 2 526 353 T3

<130>8724PTEP
 <140> EP08763785.6
 <141> 21-03-2008
 5 <160>8
 <170>BiSSAP1.0
 10 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Trichoderma atroviride*
 15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /tipo de molécula = "ADN" /organismo = "*Trichoderma atroviride*"
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1..20
 <223> /observación = "cebador de PCR del gen *Ech42*"
 25 <400> 1
 gttctgaggc tggaggtgc 20
 <210>2
 <211>20
 30 <212> ADN
 <213> *Trichoderma atroviride*
 <220>
 <221> fuente
 35 <222> 1..20
 <223> /tipo de molécula = "ADN" /organismo = "*Trichoderma atroviride*"
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> 1..20
 <223> /observación = " cebador de PCR del gen *Ech42*"
 <400> 2
 45 acgccgtcta ctcaccaac 20
 <210>3
 <211>25
 <212> ADN
 <213> *Trichoderma atroviride*
 50 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /tipo de molécula = "ADN" /organismo = "*Trichoderma atroviride*"
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1..25
 <223> /observación = "Sonda para *Ech42*. Nucleótidos polimórficos en posición 9, 20."
 60 <400> 3
 taccctca atcacaatt gtag 25
 <210>4
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> *Trichoderma atroviride*
 <220>
 <221> fuente
 5 <222> 1..20
 <223> /tipo de molécula = "ADN" /organismo = "*Trichoderma atroviride*"
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> 1..20
 <223> /observación = "cebador de PCR del gen *Tga3*."
 <400> 4
 15 tgttgaagca ttgggttga 20
 <210>5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Trichoderma atroviride*
 20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /tipo de molécula = "ADN" /organismo = "*Trichoderma atroviride*"
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1..20
 <223> /observación = "cebador de PCR del gen *Tga3*."
 30 <400> 5
 tgattgaggt gacgttctcg 20
 <210>6
 <211>23
 <212> ADN
 <213> *Trichoderma atroviride*
 40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /tipo de molécula = "ADN" /organismo = "*Trichoderma atroviride*"
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1..23
 <223> /observación = "sonda para *Tga3*"
 50 <400> 6
 aaggagttaa cgaagaagt gga 23
 <210>7
 <211> 2137
 <212> ADN
 <213> *Trichoderma atroviride*
 55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..2137
 60 <223> /tipo de molécula = "ADN" /observación = "cds completa del gen chit-HAR3 de *Trichoderma harzianum*
 para endoquitinasa-HAR3"/organismo = "*Trichoderma atroviride*"
 <400> 7

ES 2 526 353 T3

ctaccagtct aagcatatcg gagaaatgcc accaccagca acgttgctag acttggcgag 60
gtgcggcata gttcagtgat atgcgccggg gcacccctg gatatgctta tcttctgaat 120
ctggggaact tgggaattct acgagtcgac agccgccgag ccttgggcac gggacagggg 180
ccacaagctc ttgcacgatg gcactattcc agagcagaag tgagcataac gttgcgattg 240
accatgtagg caaagcatgg gttacatacc tactcgtgct tagaaccoga aaggaagct 300
tcataagttg acttcagatt tcgttgaaca ataggaggct ccacaatcac ttataaatat 360
gtgcacatcc ttccagcact tcggatgaaa attccatcca gcagcagcaa cttggagagc 420
tctattcagc agcaacttct tcctttcaaa gcactctctg aaaaactttg ctgaatctca 480
aacacttcac catgittggc ttccctggaa aatccgtggc cctgcttgcct gcgctgcagg 540
ccactctcat ttctgcatct cctgtaactg caaacgacgt ctctgttgag aagagagcca 600
gtggatacgc aaacgccctc tacttcacca actggtgagt gaagctgctt cagagtcatg 660
aaaatcaggg ctaacaattg gtgattgaag gggatattac ggccgcaact tccagcctca 720
gaacctggtt gcgtcggaca tcactcatgt catctactcg ttcctgaact tccaagcaga 780
cggcaactgtg taagttttga agacaagagt caagatattc tgatttccat attcagttac 840
taatcttttc acctgcagcg tctctggaga tgcctacgcc gattatcaga agcactatga 900
cgacgactgt atgctagccc tactcctttt gttctctctt gtttttgagc tcttcaggta 960
tgctaacgtc tacaacagcc tggaaacgag tcggttaaca tgcgtacggc tgtgtgaagc 1020
agctgttcaa gctgaagaag gccaaaccga acttgaaggt tatgctttcc atcgggtgct 1080
ggacctggtc caccaacttt cctctgcag caagcacoga tgccaaccgc aagaactttg 1140
ccaagactgc catcaccttt atgaaggact ggggtttcga tggatttgac gtcgactggg 1200
agtacctgc cgatgatacc caggccacca acatggttct tctgctcaag gagatccgat 1260
ctcagctaga tgctatgct gcgcaatacg ctccgggcta ccacttcctt ctttccattg 1320
ctgccccgcg tggcccagag cactactctt tctgcacat gtcgacctt ggccaagttc 1380
tcgactatgt caacctcatg gcctacgact atgctggttc ttggagcagc tactccggac 1440
atgatgcaa cttgtttgc taaacctca accccaacte ttcaccatac aacaccgatc 1500

ES 2 526 353 T3

aagctatcaa ggactatata aaggggggtg ttcccgcaag caagatcggt cttggcatgc 1560
 ccattctacgg acgagcttcc gagagcacog gtggcattgg ccagacctac agtgggaattg 1620
 gatctggaag ctgggagaac ggtatctggg actacaaggt tcttcccaag gccggagcta 1680
 cagtccagta tgactctgtc gcacaggcat actacagcta tgaccccagc agcaaggagc 1740
 tcattctcttt cgataccctt gacatgatca acaccaaggt ctcttacctc aagaacctcg 1800
 gcctgggagg cagcatgttc tgggaagcct ctgctgacaa gactggctct gactccttga 1860
 tcggaacaag ccacagagct ctgggaagcc tggactccac tcagaacttg ctgagctacc 1920
 ccaactccca gtatgataac atccgaagcg gtctcaacta gagatctgtc ttcttgttat 1980
 ctttttctt ttacttcccc tcatggttgt accaacattt cacacacgtt atgcgaaacg 2040
 attatgcagg gagcgttatt ttttagtaaa tagttgccct ttgagatata tgaatctgta 2100
 cataaagaac tactagcaga tataaggaga catgcag 2137

<210>8

<211> 1470

5 <212> ADN

<213> *Trichoderma atroviride*

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1470

<223> /tipo de molécula = "ADN" /observación = " cds completa del gen *Tga3* (*tga3*) de la subunidad alfa de la proteína G de *Trichoderma atroviride*" /organismo = "*Trichoderma atroviride*"

<400> 8

15

atggggggct gcatgagctc gaacaatgac gaggtagagc agaaaaagag gagccaggcc 60
 atcgacaaag agttggacga ggactccaaa aggctacgga aagaatgcaa gatcctgctg 120
 ctaggtagct tttggacacg gccgtcgacg cgtggccgca cccaatcgc tcgcccgtcc 180
 atctttctca tctgtcttg tttctaggtt ctggtgagag tggcaagtcg accattgtca 240
 agcagatgaa aatcatccac ctcaaggggt actcagaaga ggagctgtac aactacagac 300
 cgaccgtggt caagaatctg gtcgaatgtg ccaaggctgt catcaactgcc atgcagcagt 360

ES 2 526 353 T3

ttagcataga gctggcacia gacgacaaca gagcccacgc cgacttttta atagactacc	420
aagcagaatc cgggcccag gctcacatcg accccaaggt gggcctcgct gtgcaggcca	480
tatggagcga cccggcgaaa gacgagctga tggaacatca gacggagttt tacctgatgg	540
attctgcgga atagtaagtt acatcatcgc gatgctcgtt aggtcgcagc ggcgcgcgaa	600
attgacctgc tccttgatt ctaacctgc cgcctcctgt agtttcttcc aagaagcaat	660
gcgattgtc gctcccgatt atttaccxaa cgagatggac gtattacgcg ccogtacaaa	720
aaccaccggt atctacgaaa cacgcttcca aatgggacag cttagtatcc agtatgttga	780
agcattgagt ttgaaacatt ctageccaagg gccgctgac gttcttcttt agcatgtttg	840
acgttggcgg gcaaaggagt gaacgaaaga agtgatata ctgcttcgag aacgttacct	900
caatcatttt ctgtgttgcg ctgagcgaat acgatcaagt tctctcagag gagagcagtc	960
aggtacgtcg tgcgacagaa agccgaagag ccccatgggt cgatgggcaa tgcaagcgaa	1020
cgaggctcgg ccaaggctga cttgtaatgt gaatgcagaa ccgcatgatg gaaagcttac	1080
tgctgttcga ctcggttgc aactcagtt ggtttatgag aaccagcacc atctcttcc	1140
tgaacaaggt ggacatcttc aagcagaaac tgggtcgcct acccttatcc aacttcttcc	1200
ccgattacac tggcgggtacc gacgtcaaca aggcagcaa gtacctgcta tggcggttca	1260
atcaagtcaa cagggcgcac cttaatctat atccacagta agtgaagcag gcagatggta	1320
tatgcatcta ccacctcaag ccactggcta acaagatttg cccatcacag tcttaccag	1380
gccaccgata catcaaatat ccggctagtt ttgcagcag tcaaagagac aatactgaat	1440
aacgcgctaa aggattcggg tattctttaa	1470

REIVINDICACIONES

1. Una cepa aislada de SC1 de *Trichoderma atroviride*, CBS nº 122089, como agente de biocontrol.
- 5 2. La *Trichoderma* según la reivindicación 1 para el tratamiento de enfermedades fúngicas de las plantas.
3. Una composición agrícola que comprende la SC1 de *Trichoderma atroviride* aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 como principio activo.
- 10 4. La composición según la reivindicación 3 que comprende una cantidad eficaz de 10^2 - 10^3 conidios ml^{-1} o g^{-1} .
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3-4 que comprende además un segundo agente de biocontrol y/o un aditivo, un emulsionante, un nutriente para las plantas, un agente de humectación, un micronutriente de las plantas o un sustrato.
- 15 6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en la que el sustrato se selecciona del grupo que consiste en: un medio de cultivo nutritivo, un cereal o un derivado de los mismos, un abono, un vegetal o una parte del mismo, turba, madera o un trozo de la misma, arcilla o cortezas.
- 20 7. Un procedimiento de preparación de una composición agrícola que comprende una inoculación de SC1 de *Trichoderma atroviride* aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en o sobre un sustrato y que permite que crezca a una temperatura comprendida de 1-30 °C hasta que se obtienen varios conidios de al menos 10^2 - 10^3 ml^{-1} o g^{-1} .
- 25 8. Un procedimiento de preparación de una composición agrícola según la reivindicación 7 que comprende además una etapa de liofilización.
9. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho sustrato se selecciona del grupo que consiste en: un medio de cultivo nutritivo, un cereal o un derivado del mismo, un vegetal o una parte del mismo, madera o un trozo de la misma, un abono, turba, arcilla o corteza.
- 30 10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho medio de cultivo nutritivo comprende al menos una fuente de carbono y una de nitrógeno.
- 35 11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en manosa, galactosa, sacarosa, extracto de malta, celobiosa, glucosa y trehalosa.
12. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha fuente de nitrógeno se selecciona del grupo que consiste en: extracto de levadura, nitrito, triptona, peptona, glutamina y asparagina.
- 40 13. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho cereal es arroz o trigo.
14. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho sustrato se trata con un medio de cultivo nutritivo antes del inóculo de SC1 de *Trichoderma atroviride*.
- 45 15. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicho medio de cultivo nutritivo se pulveriza sobre el sustrato.
- 50 16. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicho sustrato pulverizado es corteza.
17. Un procedimiento de protección de una planta de la enfermedad producida por un hongo patógeno de las plantas **caracterizado por** tratar al menos una parte de la planta o la tierra dentro de la proximidad de dicha planta con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4.
- 55 18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que dicha parte de una planta es una hoja, un fruto, una semilla, una herida.
19. El procedimiento de la reivindicación 17, **caracterizado porque** la composición se prepara según la reivindicación 6.
- 60 20. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 17-19, en el que dicho hongo patógeno se selecciona del grupo que consiste en aquellos que causan enfermedades de la madera (*Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Fomitiporia mediterranea*), enfermedades foliares (el agente causante del oídio *Podosphaera xanthii*), enfermedades de las frutas y las flores (*Botrytis cinerea*) y enfermedades de la raíz producidas por el género *Armillaria* (*Armillaria mellea* y *A. gallica*).
- 65

21. El procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha planta se selecciona del grupo que consiste en: *Cucurbitaceae, Rosaceae, Vitaceae, Crucifereae, Compositae, Umbelliferae Solanaceae* y *Liliaceae*.
- 5 22. El procedimiento según la reivindicación 21, en el que dicha planta se selecciona del grupo que consiste en: *Cucurbitaceae, Rosaceae* o *Vitaceae*.
23. Un liofilizado o un cultivo en agar de SC1 de *Trichoderma atroviride* según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 10 24. Un sustrato que comprende una cantidad eficaz del microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o tratado con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5.
25. El sustrato según la reivindicación 24 obtenible según el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6-15.
- 15 26. El sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 24-25, que es corteza.
27. Un procedimiento para la detección específica de SC1 de *Trichoderma atroviride*, en el que la amplificación en paralelo del gen endoquitinasa 42 (*ech42*), nº de acceso GenBank AB041753.1 (SEC ID Nº: 7), y de un gen de la subunidad α de la proteína G (*tga3*), nº de acceso GenBank AF452097.1 (SEC ID Nº: 8), se logra por PCR con conjuntos de cebadores adecuados y, en el que en una muestra que comprende dicha SC1 de *Trichoderma atroviride* se identifican específicamente dos nucleótidos polimórficos en la posición 185 y 196 del gen endoquitinasa 42.
- 20 28. Un procedimiento según la reivindicación 27, en el que el conjunto de cebadores para la amplificación del gen de endoquitinasa 42 (*ech42*) tiene la secuencia SEC ID Nº: 1 y SEC ID Nº: 2 y en el que el conjunto de cebadores para la amplificación del gen de la subunidad α de la proteína G (*tga3*) tiene la secuencia SEC ID Nº: 4 y SEC ID Nº: 5.
- 25 29. Un procedimiento según la reivindicación 28 que es una PCR en tiempo real y, en el que la sonda para la (*ech42*) comprende los nucleótidos polimórficos en la posición 185 y 196 del gen de endoquitinasa 42, preferentemente correspondiente a SEC ID Nº: 3.
- 30

Figura 1

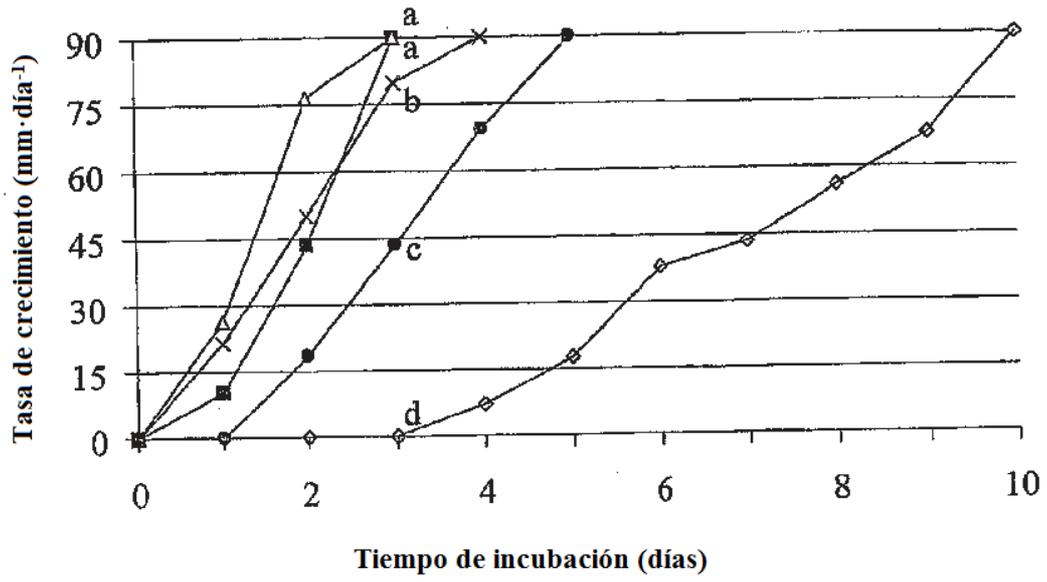


Figura 2

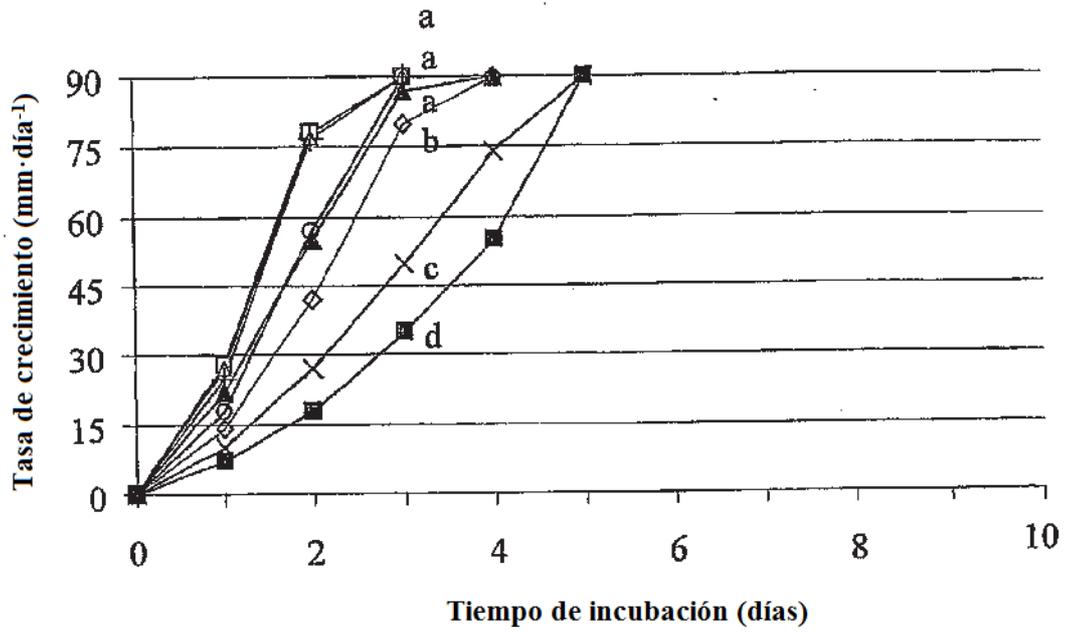


Figura 3

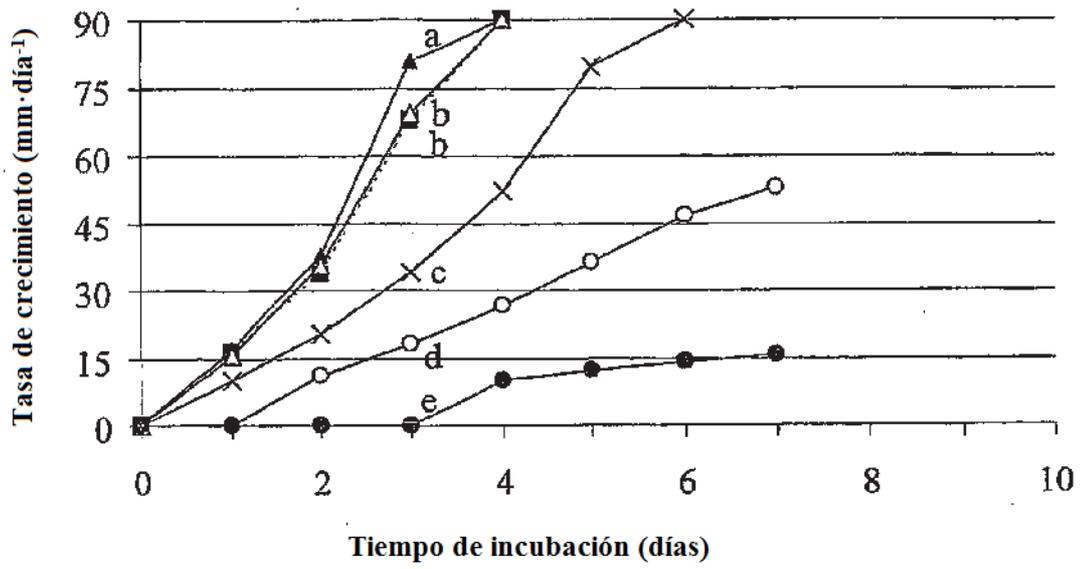


Figura 4

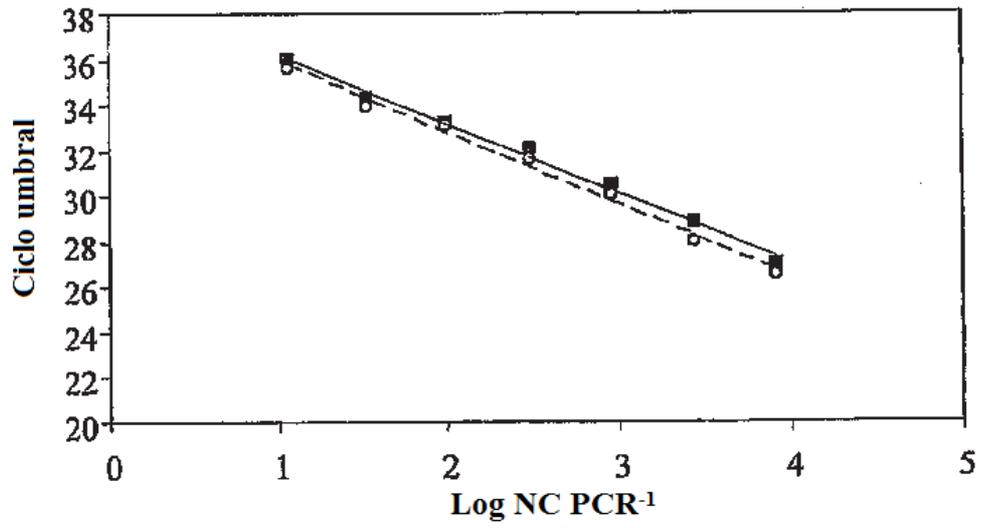


Figura 5

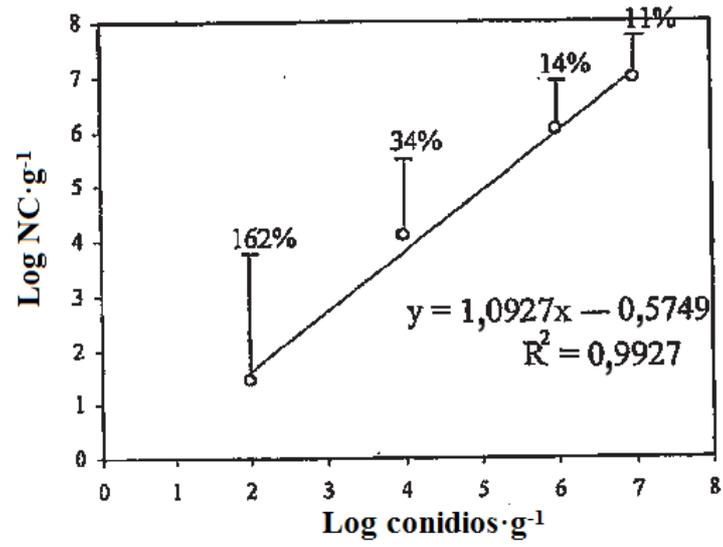


Figura 6

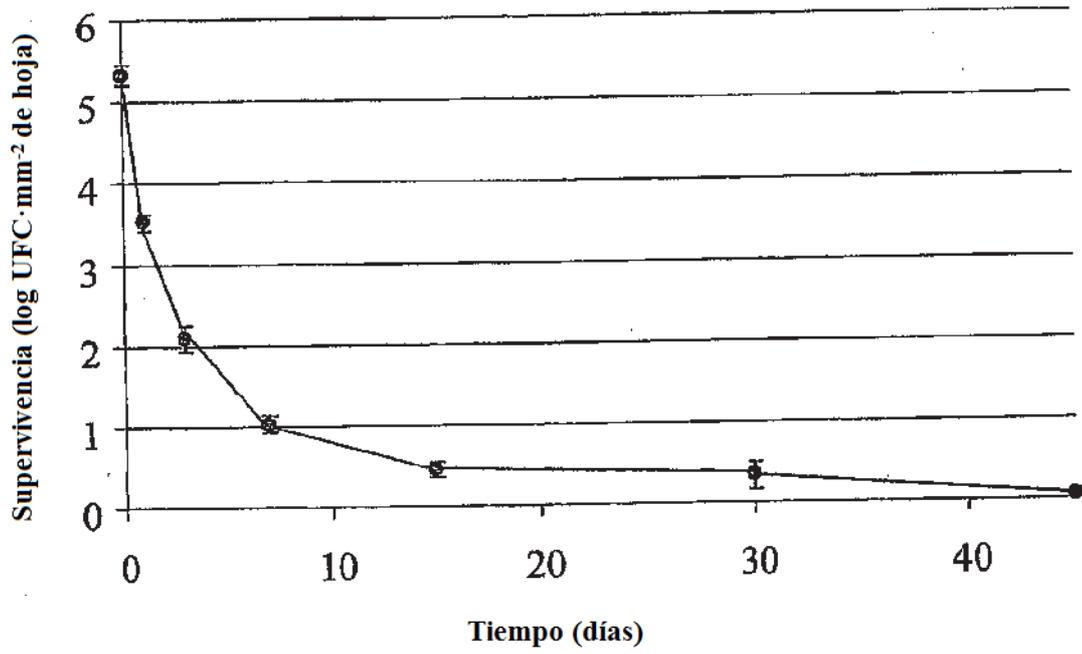


Figura 7A

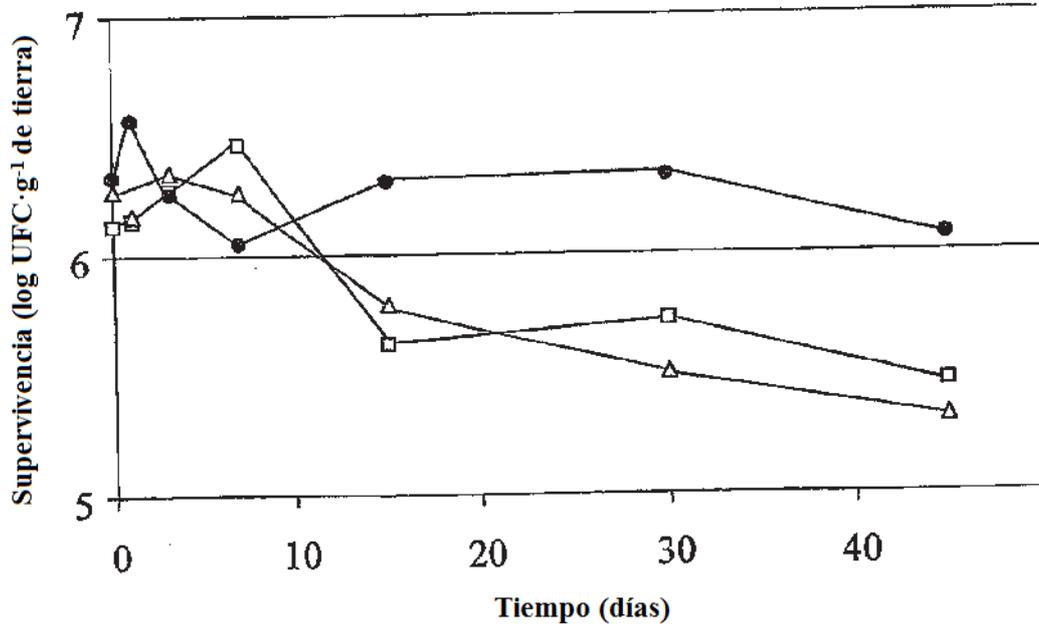
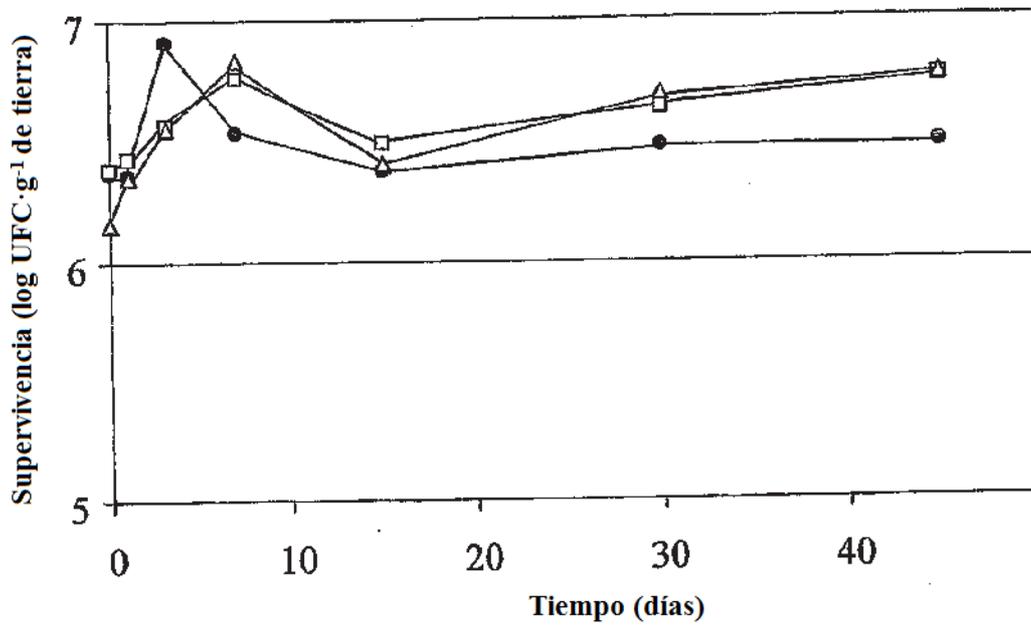


Figura 7B

Figura 8A

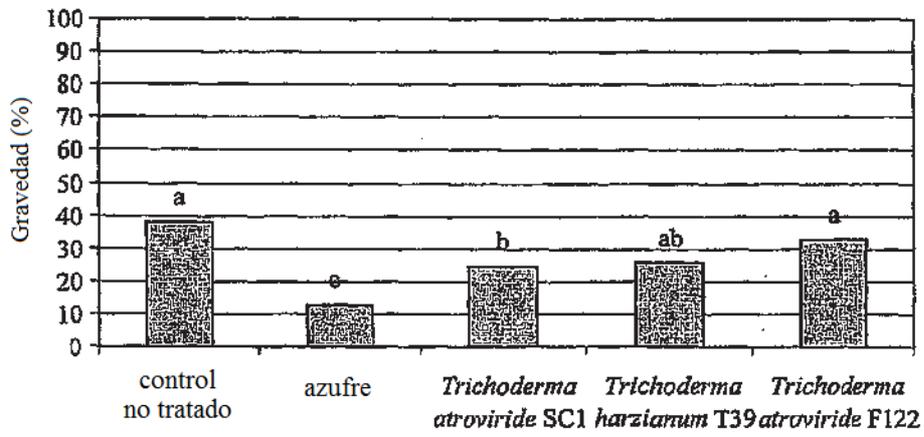
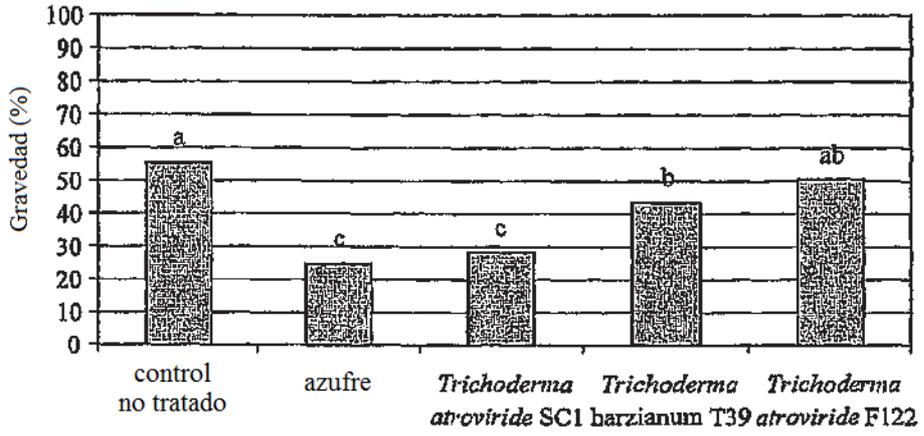


Figura 8B

Figura 9A

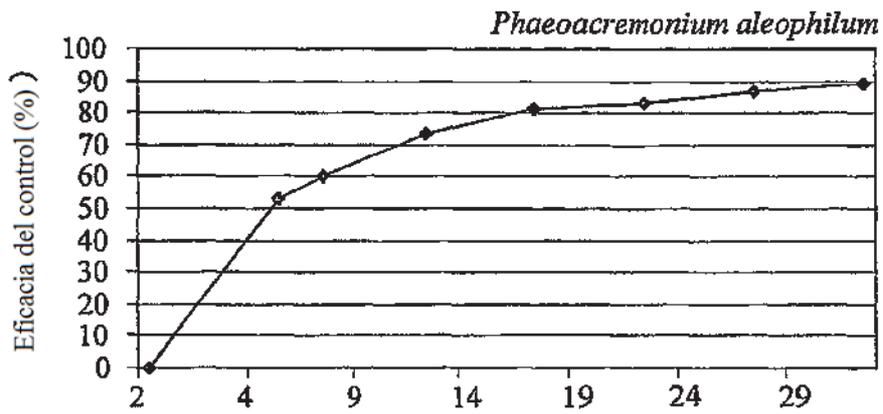
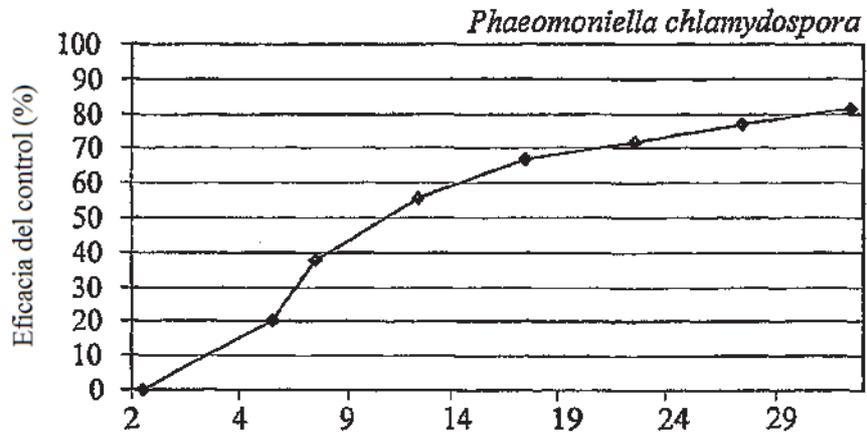


Figura 9B

Figura 9C

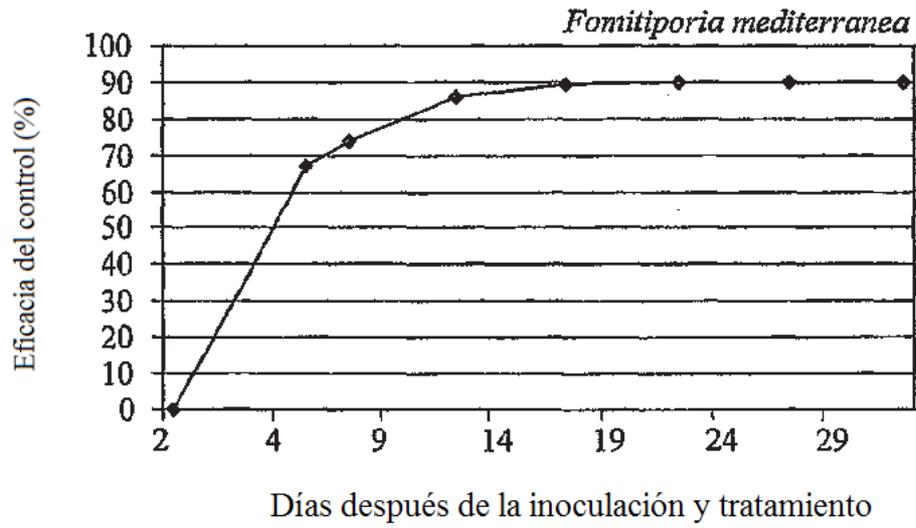


Figura 10

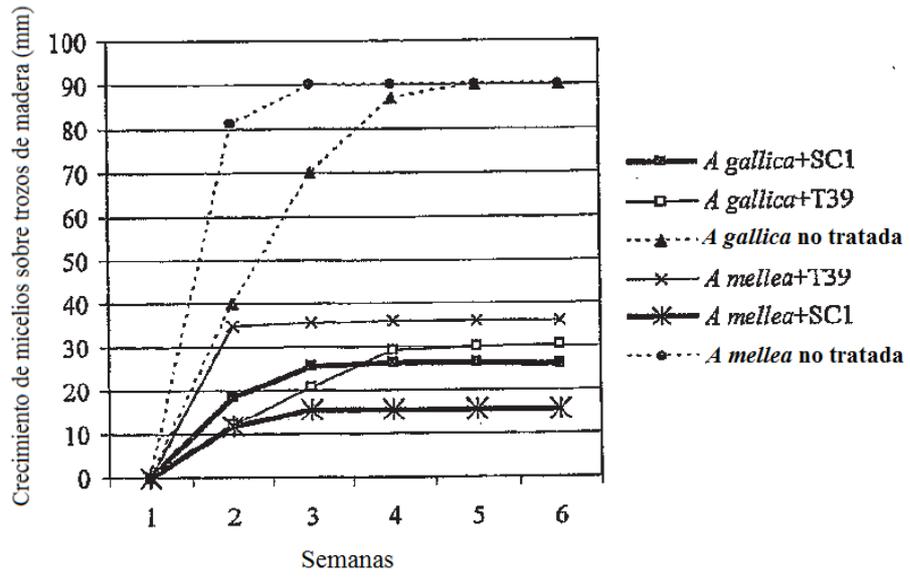


Figura 11

