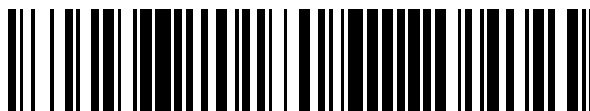


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 287**

51 Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

C12P 1/02 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008** **E 08860998 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015** **EP 2230918**

54 Título: **Nuevos microorganismos que controlan los patógenos de plantas**

30 Prioridad:

14.12.2007 EP 07123275

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

29.06.2015

73 Titular/es:

**STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG
ONDERZOEK (100.0%)
Droevendaalsesteeg 4
6708 PB Wageningen, NL**

72 Inventor/es:

KÖHL, JÜRGEN ANTON

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 539 287 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

Nuevos microorganismos que controlan los patógenos de plantas

5 Campo de la invención

La invención se relaciona con el campo de control del patógeno de la planta, particularmente en hojas, frutos o espigas, más particularmente en cultivos del fruto, tal como manzana, y particularmente para el control de la enfermedad foliar fúngica sarna del manzano (*Venturia inaequalis*).

10

Antecedentes de la invención

15

La sarna del manzano es de gran importancia económica en las áreas donde se cultivan las manzanas. Si no se controla, la enfermedad puede causar pérdidas extensivas (70 por ciento o más) donde se produce clima húmedo, fresco durante los meses de primavera. Las pérdidas resultan directamente de las infecciones del fruto o pedicelo, o indirectamente a partir de la defoliación repetida que puede reducir el crecimiento del árbol y rendimiento.

20

La sarna del manzano (ver Figura 1) se puede observar en hojas, peciolas, flores, sépalos, fruto, pedicelos, y menos frecuentemente, en brotes jóvenes y escama de la yema. Las primeras lesiones se encuentran frecuentemente en las superficies inferiores de las hojas a medida que surgen y se exponen a la infección en la primavera. Más tarde, como las hojas se despliegan, ambas superficies se exponen y se pueden volver a infectar. Las lesiones jóvenes son aterciopeladas marrón a verde olivo y tienen márgenes ligeras, poco definidos. Con el tiempo, los márgenes se vuelven distintos, pero se pueden oscurecer si varias lesiones se combinan. Como una hoja infectada se envejece, los tejidos adyacentes a la lesión se espesan, y la superficie foliar se deforma. Las hojas jóvenes se pueden volver rizadas, empequeñecidas, y deformadas cuando las infecciones son numerosas. Las lesiones pueden permanecer en la superficie foliar superior e inferior durante toda la temporada de cultivo; ocasionalmente, las células subyacentes se vuelven marrones y mueren, de manera que las lesiones marrones son visibles en ambas superficies. El número de lesiones por hoja puede estar en el intervalo de una a dos a más de un centenar. El término "sarna de la hoja" se usa frecuentemente para referirse a las hojas con sus superficies enteras cubiertas de la sarna. Las hojas jóvenes con sarna de la hoja frecuentemente se secan y caen del árbol. Las infecciones de peciolas y pedicelos resultan en la abscisión prematura de hojas y fruto, respectivamente. A finales del verano o principios del otoño, las lesiones pueden aparecer blanquecinas debido al crecimiento de un hongo secundario en la superficie de la lesión.

25

30

35

Las lesiones en el fruto joven parecen similar a los de las hojas, pero como el fruto infectado se agranda, las lesiones se vuelven marrones y acorchan. Las infecciones a principios de la temporada pueden causar fruto que se desarrolla de forma desigual según las partes no infectadas continúan creciendo. Las grietas aparecen después en la cáscara y pulpa o el fruto puede deformarse. La superficie entera del fruto es susceptible a la infección, pero las infecciones a principios de la temporada se concentran generalmente alrededor del extremo del cáliz. Las infecciones de los frutos que se producen a finales de verano o principios del otoño pueden no ser visibles hasta que el fruto se encuentran en almacenamiento. Este síntoma se llama sarna "punto de alfiler", con lesiones negras circulares ásperas en el intervalo de 0.004 a 0.16 pulgada (0.1-4 mm) en diámetro.

40

45

Aunque la investigación en Nueva York ha demostrado que el hongo sarna puede hibernar en los árboles como conidia en escamas de las yemas, el patógeno generalmente hiberna en hojas y frutos en el suelo del huerto. Las ascosporas son la principal fuente de inóculo primario y se producen dentro de pseudotecios que se desarrollan en las hojas durante los meses de invierno. En un año típico en la mayoría de los lugares, las primeras ascosporas maduras son capaces de causar infecciones en aproximadamente la época de brotación o poco después de eso. Las ascosporas continúan hasta madurar y se descargan durante un período de cinco a nueve semanas, con descarga máxima durante las etapas fenológicas de rosado a la caída de pétalos. La longitud de tiempo requerido para que ocurra la infección depende del número de horas de humedad continua en las hojas y la temperatura durante el período húmedo. Las hojas jóvenes permanecen susceptibles durante cinco a ocho días, pero sus superficies inferiores se pueden volver a infectar al final del verano. Para el fruto, la duración del período húmedo necesario para la infección aumenta con la edad del fruto, que permanece susceptible hasta la cosecha. Una vez que el hongo se establece en la hoja o fruto, forma conidias en la superficie de la lesión y se vuelven en la fuente de inóculo secundario para el resto de la temporada. Los conidias se diseminan mediante la salpicadura de la lluvia y el viento para desarrollarse en hojas y frutos. Varios ciclos secundarios de infección conidial pueden ocurrir durante la temporada de cultivo dependiendo de la frecuencia de los períodos de infección y la susceptibilidad del tejido del huésped.

50

55

60

El manejo de la sarna del manzano es multifacético, con cultivares resistentes, saneamiento, y productos químicos que se usan todos hasta cierto grado dependiendo del sistema de huerto que se usa y los objetivos del productor.

65

La mayoría de los principales cultivares de manzano son susceptibles al hongo, aunque esto varía un poco. Más de 25 cultivares resistentes a la sarna se han liberado, incluidos Prima, Priscilla, Jonafree, Redfree, Liberty, Freedom, Goldrush, y Pristine. La mayoría se adaptan a las zonas de cultivo de manzanas más al norte de los Estados Unidos. Todos los cultivares resistentes a la sarna varían en su susceptibilidad a otras enfermedades de principios de

temporada; y todos son susceptibles a las enfermedades de verano. Algunos cultivares de manzano recientemente liberados que no han generado específicamente la resistencia a la sarna muestran además niveles diversos de susceptibilidad a la sarna.

5 La prevención de la formación pseudotecial en la hibernación de las hojas del manzano, probablemente puede eliminar la sarna como una seria amenaza para la producción de manzanas. Desafortunadamente, la eliminación completa de pseudotecios no es posible en condiciones de huerto con los métodos actuales.

10 La sarna del manzano se controla principalmente con atomizadores fungicidas. Una variedad de atomizadores fungicidas con diferentes modos de acción están disponibles. Cuándo y cómo se usan depende de su modo de acción. Los fungicidas protectores previenen las esporas a partir de que germinen o penetren el tejido de la hoja. Para que sea eficaz, se debe aplicar a la superficie del tejido susceptible antes de que ocurra la infección. La aparición de la infección se puede, entre otros, predecir con un pronóstico preciso del clima. Los fungicidas protectores se aplican rutinariamente en intervalos de 7 a 10 días o de acuerdo con los períodos de infección previstos.

15 Posterior a la infección, los fungicidas controlan el hongo sarna dentro de las hojas y fruto. Estos productos químicos pueden penetrar los tejidos de la planta para eliminar o inhibir el desarrollo de la lesión. La capacidad de estos fungicidas para detener las infecciones se limita a unas pocas horas, o hasta unos pocos días (dependiendo del fungicida específico), y su efecto frecuentemente varía de acuerdo con las temperaturas durante las primeras 24 a 48 horas después de la infección. Algunos fungicidas pueden inhibir el hongo incluso más tarde en el período de incubación (el tiempo entre la infección y la aparición de los síntomas). La erradicación de las lesiones de la sarna después de que aparecen usualmente no suele ocurrir, pero se puede lograr con la velocidad adecuada y el momento de ciertos fungicidas. La selección de los fungicidas para el manejo de la sarna se basa en varios factores, que incluyen todo el espectro de otras enfermedades que se debe manejar en ese momento, el potencial para la resistencia a la sustancia química seleccionada en el hongo de la sarna, la historia de la enfermedad en un huerto particular, el mercado final para el fruto, y otros factores sociales y económicos. Las buenas prácticas hortícolas, tales como la selección del sitio adecuado, el espaciamiento de árboles y poda anual, facilita mejor el control de la sustancia química mejorando la cobertura de la atomización y reduciendo la duración de los períodos húmedos. Los fungicidas químicos usados en el tratamiento o prevención de la sarna del manzano incluyen maneb, mancozeb, captán, pirimetanil y tolifluanida.

30 Existe, así, todavía la necesidad de un fungicida natural, que sea eficaz para el control de la sarna del manzano, y que sea favorable al medio ambiente y no tóxico para los seres humanos y/o animales.

Breve descripción de la invención

35 Los inventores han encontrado dos nuevos aislados de *Cladosporium cladosporioides*, es decir, *C. cladosporioides* H39, que se depositó el 13 de diciembre de 2007 bajo el número CBS 122244 con la Centraal Bureau Schimmelcultures, Baarn, Países Bajos y *C. cladosporioides* R406, que se depositó el 13 de diciembre de 2007 bajo el número CBS 122243 con el Centraal Bureau Schimmelcultures, Baarn, Países Bajos. Dichos aislados son útiles en una composición para controlar un patógeno de hojas, frutos y espigas de la planta. Una composición de ese tipo es preferentemente útil para enfermedades en donde dicho patógeno de la planta se selecciona del grupo que consiste en sarna del manzano (*Venturia inaequalis*), sarna de la pera (*Venturia pirina*), mancha foliar (*Blumeriella jaapi*), mancha negra de las rosas (*Diplocarpon rosae* / *Marssonina rosae*), mancha marrón (*Stemphylium vesicarium*), oidio (*Podosphaera leucotricha* / *Sphaerotheca pannosa*), oidio de la begonia (*Microsphaera begoniae*), oidio de la fresa (*Sphaerotheca macularis*), mancha de hollín (*Gloeodes pomigena*), mancha de mosca (*Zygophiala jamaicensis*), lepra del duraznero (*Taphrina deformans*), podredumbre parda/cancro del brote (*Monilia fructigena*, *M. laxa*), moho de la pera (*Gymnosporangium sabinae* / *G. fuscum*), cancro (*Nectria galligena*), mancha negra de las rosas (*Diplocarpon rosae*), moho de las rosas (*Phragmidium tuberculatum* / *Phragmidium spp.*), *Botrytis* spp. en varias plantas, *Mycosphaerella brassicicola* en repollo, *Mycosphaerella fijiensis* en banana, *Alternaria* spp. en Brassica, patata y otras varias plantas, *Fusarium* spp. especialmente en cereales que incluyen maíz, *Phytophthora infestans* de patata y *Plasmopara viticola* en la vid, con mayor preferencia en donde dicho patógeno foliar fúngico es la sarna del manzano.

Además, en una composición de ese tipo, el *Cladosporium* está presente como esporas y comprende además un portador para las esporas de *Cladosporium*, preferentemente en donde dicho portador es glucosa. Alternativamente, la composición puede comprender conidias del *Cladosporium* de la invención.

En otra modalidad, la invención comprende un método para controlar un patógeno en las plantas, que comprende tratar dichas plantas con una composición de acuerdo con la invención. Preferentemente, dicha composición se atomiza sobre las hojas, frutos o espigas de la planta. Un método de ese tipo para el control del patógeno comprende la prevención de la infección y/o una disminución del daño de la planta causado por dicho patógeno. Dicho método será utilizable contra cualquier patógeno mencionado anteriormente, preferentemente contra sarna del manzano. Una modalidad adicional en la presente invención es el uso de un aislado de *Cladosporium* de acuerdo con la invención o una composición de acuerdo con la invención para la prevención o tratamiento de la infección de hojas, frutas o espigas de una planta por un patógeno. Se comprende además en la invención una cepa de *Cladosporium* o una composición de acuerdo con la invención para el uso en el control de una infección por patógeno de la planta.

Leyenda a las figuras

- Figura 1 Síntomas de la sarna causada por *Venturia inaequalis* (Vi) en las hojas (a) y fruto (b).
- 5 Figura. 2. Producción de conidias de Vi en las hojas del manzano tratadas dos veces por semana con *Cladosporium cladosporioides* H39 o R406 (aproximadamente 2×10^6 esporas viables ml^{-1}) en un huerto manejado orgánicamente. Randwijk 2007. Los efectos estadísticamente significativos de los tratamientos individuales en comparación con el tratamiento de control se indican con '*' por separado por cada fecha de muestreo; prueba LSD sin protección de un solo lado; ($\alpha = 0.05$). N.s.: sin diferencia significativa n.v.: sin valor
- 10 Figura. 3. Periodos de infección predichos, fechas de aplicaciones de atomizador de *Cladosporium cladosporioides* H39 y azufre, y fechas de muestreo (L: Etiquetado de nuevas hojas; S: Muestreo).
- Figura. 4. Efecto de los tratamientos con conidias de *Cladosporium cladosporioides* H39 o azufre en la producción de conidias de *Venturia inaequalis*. Las barras de la misma fecha de muestreo con una letra común difieren significativamente (prueba LSD; $\alpha = 0.05$).
- 15 Figura 5. Efecto de los tratamientos con conidias de *Cladosporium cladosporioides* H39 o azufre en la gravedad de la sarna. Las barras con una letra común difieren significativamente (prueba LSD; $\alpha = 0.05$).

Descripción detallada

- 20 Como se ha detallado anteriormente, la sarna del manzano es una enfermedad con enormes impactos económicos para los productores de manzanas. Este es especialmente el caso de control de la sarna del manzano por los agricultores orgánicos, que tienen pocos o ningún pesticidas químicos alternativos, especialmente ahora que algunos de los agentes, que se usan comúnmente tienden a que se eliminen debido a los riesgos de toxicidad ambiental y generales.
- 25 Una alternativa está siendo buscada en forma de extractos a partir de plantas, desde que los extractos de plantas han descrito como posibles candidatos para tratar enfermedades fúngicas y ya que éstos pueden cumplir con los requisitos para el cultivo ecológico. Recientemente, el uso de extractos de *Yucca* se ha documentado (WO 2007/139382).
- 30 Sin embargo, junto a los extractos de plantas además los microorganismos de origen natural son útiles en el control de los patógenos de plantas. Especialmente muchos hongos son conocidos debido a sus efectos biocidas, tales como *Penicillium* y *Trichoderma*. Más específicamente, existen además hongos que son especialmente útiles contra los agentes patógenos de plantas. Además en el caso de la sarna del manzano tales hongos se han descubierto, tales como *Chaetomium globosum* (Boudrau, M.A. y otros, 1987, Phytopathol. 77:1470-1475), *Microsphaeropsis ochracea* (Carisse, O. y otros, 2000, Phytopathol. 90:31-37), *Ophiostoma* sp. y *Phoma* sp. (Ouimet, A., y otros, 1997, Can. J. Bot. 75:632-639). Descripciones generales se pueden encontrar en Burr, T.J. y otros, 1996, Biol. Control 6:151-157 y Fiss, M. y otros, 2003, Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz, 110(6):513-523. Recientemente, se ha descrito (Ziedan, E.H.E., 2006, Res. J. Agric. & Biol. Sci. 2(6):262-267) que un aislado de *Cladosporium cladosporioides*, derivado de filosfera de la vid, administrado junto con el ácido benzoico fue eficaz contra el oidio lanoso de la vid que causa hongos *Plasmopara viticola*. Además se encontró que los aislados particulares de *Cladosporium cladosporioides* se pueden usar contra infecciones de *Botrytis* y *Fusarium* (Newhook, F.J., 1957, New Zealand Journal of Science and Technology 23:23-54. Eden y otros, 1996, Plant Pathol. 45:276-284). Fiss, M. y otros (Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, vol. 107, no.1, 2000, páginas 1-11) describieron hongos epifíticos aislados, por ejemplo aislados de *Cladosporium*, como agentes de biocontrol contra la sarna del manzano (*Venturia inaequalis*).
- 40 En la presente invención, ahora se ha descubierto que dos aislados de *Cladosporium cladosporioides* son eficaces contra las enfermedades del patógeno foliar fúngico, tales como la sarna del manzano. Estos dos aislados son *Cladosporium cladosporioides* H39 y *Cladosporium cladosporioides* R406, depositados el 13 de Diciembre 2007 con el Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Países Bajos bajo los núms. CBS 122244 y CBS 122243, respectivamente. Como se muestra en la sección experimental de la especificación, estos dos nuevos aislados tuvieron un efecto claro sobre el desarrollo de la sarna del manzano, mientras que otros aislados de *Cladosporium cladosporioides* no tuvieron ningún efecto. La investigación general sobre este tema se discutió en dos informes de Köhl, J. (Replacement of copper fungicides in organic production of grapevine and apple in Europe, publicado bajo el programa de subvenciones Europeo REPCO 501452) donde, sin embargo, no se dieron detalles de los aislados.
- 45 *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries pertenece al grupo de los *Fungi imperfecti* y su crecimiento se caracteriza por colonias de aproximadamente 3 cm de diámetro cuando se cultivan durante siete días en agar de patata-dextrosa a 20 °C. Las colonias de *Cladosporium cladosporioides* son difundidas, verde olivo o marrón oliváceo, aterciopeladas; se invierten en agar malta negro verdoso. Los conidióforos son macronematous y micronematous, a veces hasta 350µ de largo, pero generalmente mucho más cortos, 2-6µ de grueso, pálido a color marrón oliváceo medio, liso o verrugoso. Las ramo-conidias son septadas 0-1, hasta 30µ de largo, 2-5µ de grueso, lisa u ocasionalmente minuciosamente verrugosa. Las conidias se forman en cadenas largas ramificadas, mayormente 0-septada, elipsoidal o limoniformes, 3-11 x 2-5 (en su mayoría 3- 7 x 2-4) µ, marrón oliváceo pálido, más comúnmente lisas pero verrugosas en algunas cepas (Ellis, MB, 2001, Dematiaceous Hyphomycetes).
- 60 Se ha informado de que uno de los metabolitos, cladosporina, actúa como antifúngico. Esta cladosporina se ha
- 65

demostrado que tiene propiedades antibióticas (Scott, P.M. y otros, 1971, J. Antibiotics 24:747-755). Sin embargo, como ya se ha discutido anteriormente, se encontró en nuestros experimentos que no todos los aislados de *Cladosporium cladosporioides* tuvieron un efecto inhibitor sobre la infección de la sarna del manzano. Al parecer, ya sea la cladosporina no es funcional contra *Venturia inaequalis*, o, más probablemente, los aislados del hongo difieren en su fenotipo de expresión y secreción de la cladosporina. Posiblemente, además otros mecanismos de modo-de-acción se implican en el antagonismo de H39 y R406 hacia *Venturia inaequalis* y otros patógenos de plantas.

Cladosporium spp. son colonizadores epifíticos comunes de las superficies foliares, frecuentemente se encuentran en altas densidades (Dickinson, 1981). La colonización epifítica por *Cladosporium* spp. se informa también para las hojas del manzano (Fiss y otros, 2000) y frutos (Teixido y otros, 1999). Tales poblaciones epifíticas de *Cladosporium* spp. pueden contribuir al control biológico intrínseco de origen natural. En este caso, el control de la conservación biológica (Eilenberg y otros, 2001) que protege tales poblaciones beneficiosas evitando fungicidas con efectos secundarios en las poblaciones no objetivo y otros, 1999; (Walter y otros, 2007) o incluso estimulando selectivamente tales poblaciones beneficiosas de origen natural, por ejemplo mediante la aplicación de nutrientes específicos, puede contribuir a la prevención de la sarna.

Como se muestra en los Ejemplos, los dos aislados de la presente invención mostraron un claro efecto en el control de la sarna del manzano. Se afirma, además, que no sólo la sarna del manzano sino cualquier patógeno fúngico de plantas de las hojas, frutos o espigas se puede controlar por dichos aislados. Dicho patógeno foliar fúngico se selecciona del grupo que consiste en sarna del manzano (*Venturia inaequalis*), sarna de la pera (*Venturia pirina*), mancha foliar (*Blumeriella jaapi*), mancha negra de las rosas (*Diplocarpon rosae* / *Marssonina rosae*), mancha marrón (*Stemphylium vesicarium*), oidio de varias plantas tales como fresa, rosas y manzana, mancha de hollín (*Gloeodes pomigena*), mancha de mosca (*Zygophiala jamaicensis*), lepra del duraznero (*Taphrina deformans*), podredumbre parda/cancro del brote (*Monilia fructigena*, *M. laxa*), moho de la pera (*Gymnosporangium sabinae*/G. *fuscum*), cancro (*Nectria galligena*), mancha negra de las rosas (*Diplocarpon rosae*), moho de las rosas (*Phragmidium tuberculatum*/Phragmidium spp.), *Botrytis* spp. en varias plantas, *Mycosphaerella brassicicola* en repollo, *Mycosphaerella fijiensis* en banana, *Alternaria* spp. en *Brassica*, patata y otras varias plantas, *Fusarium* spp. especialmente en cereales que incluyen maíz, *Phytophthora infestans* de patata y *Plasmopara viticola* en la vid, preferentemente en donde dicho patógeno foliar fúngico es la sarna del manzano.

Apareció en el caso de H39 que la forma de cultivar y la formulación del hongo tuvieron una marcada influencia en el efecto inhibitor. Las conidias de *C. cladosporioides* H39 producidas en agar de harina de avena no fueron eficaces bajo condiciones de huertos pero las producidas en avena en un fermentador mostraron consistentemente efectividad moderada. Las observaciones microscópicas mostraron que las conidias producidas en avena en un fermentador fueron más grandes que las producidas en agar de harina de avena. El efecto del medio de crecimiento en la calidad de las esporas de los antagonistas que resulta en un mejor rendimiento bajo condiciones de estrés ambiental se ha demostrado para varios otros hongos antipatogénicos, por ejemplo, células de *Candida sake* producidas en medio modificado con bajo contenido a_w (Teixido y otros, 1999). La colonización de las hojas del manzano por hongos introducido depende de la biología de las especies introducidas (Kinkel y otros, 1989). En su caso de estudio, las poblaciones introducidas de *C. globosum* disminuyó significativamente dentro de unos pocos días, en contraste con las poblaciones de *A. pullulans*. En los experimentos más abajo, las composiciones inhibitoras se aplicaron a los 3 a 4 días de intervalo para garantizar los niveles altos de poblaciones en las hojas. Sin embargo, los primeros resultados sobre la dinámica de la población de *Cladosporium cladosporioides* indican que después de la aplicación de H39 tales poblaciones aumentaron y que tales efectos del tratamiento se encontraron, aun después de varias semanas (ver Ejemplo 2).

La formulación del hongo es importante para la viabilidad de las esporas fúngicas contenidas en la composición que se aplica a la planta. Se ha observado que una formulación en donde la glucosa se usa como portador para las esporas de *Cladosporium* tiene mejor rendimiento que el hongo no formulado.

Alternativamente, una composición antifúngica puede contener un extracto de uno o ambos de los aislados de *Cladosporium* de la invención. Los extractos de los dos aislados se pueden obtener como se describe en la literatura para otros extractos de *Cladosporium*, y se pueden obtener fácilmente por una persona de experiencia en la técnica (ver, por ejemplo Ding, L. y otros, 2008, Current Microbiol., 56:229-235).

Además, la composición puede contener compuestos adicionales que son usados comúnmente en soluciones de atomización, tales como conservantes, compuestos tensoactivos, agentes humectantes, y similares. Es posible además incluir otros compuestos antifúngicos u organismos en la composición para mejorar el efecto inhibitor. En un caso de ese tipo, los niveles inferiores de fungicidas químicos tradicionales se pueden usar, permitiendo de ese modo una reducción deseada en la cantidad de fungicidas. Como se discutió anteriormente, los fungicidas químicos reducen el crecimiento del hongo patogénico de la planta, y así permitirán una oportunidad prolongada para lograr su efecto el *Cladosporium*. Se afirma así que una combinación de los aislados de la presente invención con fungicidas químicos adecuados inhibirán sinérgicamente el patógeno fúngico foliar excediendo así más allá de una simple adición de los efectos individuales. Una combinación además de los aislados de la invención con cualquier otro antagonista del patógeno foliar fúngico microbiano será útil en la presente invención.

Otra modalidad de la invención es un método para controlar un patógeno fúngico en las hojas, frutos y espigas, que comprende tratar dichas plantas con una composición de acuerdo con la invención.

En un método de ese tipo las plantas se atomizan con una composición de acuerdo con la invención antes o después de una infección con el patógeno foliar de la planta. Atomizar antes de la infección será útil para prevenir una infección. Aunque, si las esporas de los aislados no son completamente viables, por ejemplo se debe repetir regularmente la atomización anafiláctica. Si las esporas son suficientemente viables, el aislado de *Cladosporium* será capaz de crecer en la filosfera de la planta, proporcionando así una protección duradera prolongada previniendo las infecciones y reduciendo la esporulación del patógeno, retardando así las epidemias. Además, el aislado de *Cladosporium* reducirá la producción de ascosporas en la hibernación de las hojas del manzano y de esporas de otros patógenos de plantas en sus residuos lo que resultará en menos enfermedad en la temporada siguiente.

Una vez que se ha producido una infección, la atomización se debe realizar regularmente para el control eficaz de la enfermedad.

El tratamiento con una composición de acuerdo con la invención se puede hacer tanto antes de la cosecha, es decir, cuando los frutos están todavía en la planta, sino además posterior a la cosecha. Se muestra en la parte experimental que el tratamiento posterior a la cosecha es además eficaz para combatir infecciones fúngicas.

Aún otra modalidad de la invención es el uso de una cepa de *Cladosporium* de acuerdo con la invención, o una composición de acuerdo con la invención para la prevención o tratamiento de la infección por un patógeno fúngico foliar.

Una modalidad adicional de la presente invención es una cepa de *Cladosporium* como se identificó anteriormente, o una composición de acuerdo con la invención para uso en el control de una infección de patógeno foliar fúngico.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Pruebas *in vitro* y de campo 2006

Materiales y Métodos

Recolección de antagonistas candidatos

Se recogieron hojas de manzanos infectadas con sarna en Septiembre de 2004 en 216 lugares de los Países Bajos, Bélgica, y al noroeste y centro de Alemania. Los lugares de muestreo se registraron por GPS. La mayoría de las muestras, que consiste en 10 - 50 hojas, se originaron a partir de árboles estándar viejos o huertos abandonados sin ningún manejo de cosecha. A partir de cada muestra, las hojas verdes con esporulación de colonias de *V. inaequalis* se incubaron durante 3 días a 20 °C en cámaras húmedas. Después de eso, las colonias de *V. inaequalis* se inspeccionaron visualmente de 10 a 60 aumentos para el desarrollo de diferentes hongos a partir de micelio de hongos o esporas de *V. inaequalis*. Se aislaron de las partes aéreas de la colonia con una aguja estéril y se transfirieron a agar de harina de avena (20 g harina de avena, 15 g de agar, 1000 ml de agua del grifo) y agar V8 (200 ml jugo V8, 3 g de CaCO₃, 20 g de agar, 1000 ml agua del grifo), ambos contienen 100 mg l⁻¹ estreptomina y 15 mg l⁻¹ de tetraciclina. Los cultivos puros se prepararon a partir de las colonias en desarrollo.

Pre-tamizaje de los antagonistas candidatos

Un sistema de procesamiento rápido se usó para un primer control de los antagonistas candidatos con respecto a sus riesgos potenciales y la viabilidad económica del desarrollo de un producto de control biológico. Los hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* o *Fusarium* se descartaron debido al potencial de producir micotoxinas de varias especies dentro de estos géneros. El aislado restante de hongos con hifas se cultivaron en placas Petri sobre agar harina de avena durante 21 días a 18 °C y 12 h al día de luz negra; las levaduras se cultivaron en agar de levadura basal (10 g de peptona bacteriológica, 1 g de extracto de levadura, 20 g de glucosa, 20 g de agar, 1000 ml agua del grifo) durante 5 días a 18 °C. Para cada aislado, la producción de esporas o células de levadura por placa, se determinó con la ayuda de un hemocitómetro después de la preparación de las suspensiones usando agua del grifo estéril que contiene 0.01% de Tween 80. Los aislados que producen menos de 1 x 10⁵ esporas o células de levaduras por placa se descartaron. Diez µl de las suspensiones se sembraron por duplicado en los pocillos estériles, 16 mm de diámetro que contiene 1.5 ml de agar de malta (1 g de extracto de malta, 15 g de agar, 1000 ml de agua del grifo). Diferentes placas con pocillos inoculados se incubaron a 5, 18 y 36 °C en la oscuridad durante 14 días. Una placa adicional con los pocillos que contienen agar malta ajustados a aproximadamente -10 y -7 MPa mediante la adición de KCl₂ se incubaron a 18 °C durante 14 días. Los pocillos se inspeccionaron para el crecimiento fúngico y las colonias que producen hongos a 36 °C y se descartaron las que no producen colonias a 5 °C o -10 o -7 MPa. Los aislados restantes se almacenaron en agar patata dextrosa (Oxoid, 39 g, 1000 ml de agua del grifo) a 4 °C hasta su uso posterior.

Producción de inóculos fúngicos

Las conidias del aislado de monosporas MB 363B de *V. inaequalis* obtenidas de M. Bengtsson, Real de Veterinaria y la Universidad Agrícola, Frederiksberg C, Dinamarca, se produjeron siguiendo el método de Williams (1976). Frascos Duran (500 ml) con 40 ml de caldo de cultivo de patata dextrosa (24 g l⁻¹) y una mecha de gasa rectilínea de dimensiones de 10 x 25 cm se extendió sobre la superficie interior del frasco, la parte inferior tocando el medio, se trataron en autoclave y se inocularon con 250 µl de una suspensión de fragmentos miceliales de *V. inaequalis*, preparado sumergiendo un cultivo del hongo cultivado en agar de patata dextrosa con agua estéril y frotando suavemente con una espátula de goma estéril. Los frascos inoculados se incubaron a 18 °C en la oscuridad. Durante los primeros 4 días, los frascos se incubaron en posición horizontal, de manera que la mayor parte de la mecha se cubrió por el caldo de cultivo, después de eso los frascos se incubaron en una posición vertical. Los frascos se rodaron cuidadosamente en los días 2, 7 y 11 para distribuir el caldo con el crecimiento del micelio en toda la superficie de la mecha. Después de 14 días, el caldo de cultivo nutriente se decantó y se añadió 200 ml de agua del grifo estéril y los frascos se agitaron bien con la mano durante varios minutos. La suspensión conidial resultante se filtró a través de gasa de nylon estéril con una malla de 200 µm y se centrifugó a 5800 g durante 30 min a 6 °C. El sedimento con las conidias se resuspendió en agua del grifo; la concentración conidial se determinó con la ayuda de un hemocitómetro y se ajustó a 5 x 10⁵ esporas ml⁻¹ añadiendo agua del grifo estéril. La suspensión se almacenó a -18°C hasta el uso. El rendimiento fue de aproximadamente 3 x 10⁶ conidias por frasco.

Para los experimentos de tamizaje, los aislados candidatos de hongos con hifas se cultivaron en agar harina de avena durante 28 días a 18 °C y 12 h de luz negra por día; las levaduras se cultivaron en agar de levadura basal durante 5 días a 18 °C. Las suspensiones de esporas o células de levadura se prepararon por cultivos de inundación con agua del grifo estéril que contiene 0.01% de Tween 80, frotando suavemente con una espátula de goma estéril y filtración a través de gasa de nylon estéril con una malla de 200 µm. Las concentraciones de las suspensiones se determinaron con la ayuda de un hemocitómetro y las concentraciones se ajustaron a 1 x 10⁶ esporas o célula ml⁻¹ añadiendo agua del grifo estéril que contiene 0.01% de Tween 80.

Para aplicaciones en los huertos, los hongos se produjeron de la misma manera pero las concentraciones se ajustaron a 2 x 10⁶ esporas ml⁻¹. Las conidias de 2 aislados se produjeron además en un fermentador, se secaron y formularon como polvo humectante y se almacenaron a 5 °C. La viabilidad de las conidias secas se determinó antes del comienzo de los experimentos de campo en agar. La concentración de las suspensiones conidiales se ajustó a 2 x 10⁶ conidias viables ml⁻¹. La viabilidad de las esporas en las suspensiones aplicadas al campo siempre se controló de nuevo atomizando la suspensión en agar extracto de malta (1 g de extracto de malta por litro) modificado con tetraciclina a 15 mg l⁻¹ y estreptomicina a 100 mg l⁻¹ en el huerto y evaluando el porcentaje de esporas germinadas después de la incubación a 20 °C durante 24 h.

Ensayo de la plántula

Semillas de manzana cv Golden Delicious (GJ Steingaesser & Comp. GmbH, Miltenberg, Alemania) se sembraron en arena húmeda y estratificaron a 4 °C durante 6 semanas en la oscuridad. Después de eso, las semillas se cultivaron además en la arena húmeda a temperatura ambiente y la luz del día. Después de aproximadamente 14 días, las plántulas jóvenes se trasplantaron en suelo de tierra de macetas, una plántula por maceta (6 cm cuadrado, 8 cm de altura). Las plántulas se cultivaron durante 28 días con ciclos de 16 h de luz a 18 °C y 8 h de oscuridad a 12 °C. Las plantas usadas en los experimentos tuvieron al menos 4 hojas totalmente expandidas.

Las plántulas se atomizaron con suspensiones conidiales de *V. inaequalis* (1 x 10⁵ ml⁻¹) hasta que se escurrieron y colocaron en una cámara húmeda que consiste en unas bandejas de plástico cerradas por una tapa plástica transparente. Después de 2 días de incubación a 15 °C con luz difusa, las tapas se eliminaron de las bandejas y las plántulas se incubaron además durante 3 o 4 días a 85% de humedad relativa, 15 °C y 16 horas de luz por día. Después de eso, las plántulas de *V. inaequalis*-inoculadas se atomizaron con las suspensiones de los aislados encontrados anteriormente o agua que contiene 0.01% de Tween 80 como control. Dos plántulas se usaron para cada repetición de cada tratamiento. Los conjuntos de 2 plántulas inoculadas se colocaron en una carpa de polietileno en un diseño de bloques con 6 bloques (repeticiones) y la aleatorización completa dentro de los bloques. Se evitó tocar las hojas de las plantas vecinas o el polietileno. Las plántulas se cultivaron durante 9 a 12 días a 15 °C, con 16 horas de luz por día en 138 µE s⁻¹ m⁻².

A partir de ambas plántulas de cada réplica, las 5 hojas válidas más bajas (experimentos 1-5) o la hoja desplegada justo más joven al comienzo del experimento (marcado con un anillo de metal; 'hojas jóvenes') y las 3 hojas próximas a las viejas (experimentos 6-14; 'hojas viejas') se retiraron cuidadosamente. Las hojas de cada réplica del conjunto de hojas se mezclaron, colocaron en frascos Duran (100 ml) que contienen 15 ml de agua del grifo con 0.01% de Tween 80 para las muestras que contienen 2 hojas más jóvenes o; 30 ml para muestras que contienen 10 (exp 1-5) o 6 (experimentos 6-14) hojas. Los frascos se agitaron con un agitador de frasco a 700 OCS min⁻¹.

La concentración de conidias de *V. inaequalis* se determinó para cada suspensión con la ayuda de un hemocitómetro. Las superficies foliares de cada réplica del conjunto de hojas se midieron con un medidor de área (Li-COR Biosciences, modelo 3100, Lincoln, Estados Unidos).

Ensayo del huerto

Varias filas de var. Jonagold dentro de un huerto manejado orgánicamente en Randwijk, Países Bajos, se podaron durante la primavera y el verano de 2006 de manera que los árboles produjeron nuevos brotes con hojas jóvenes altamente susceptibles para *V. inaequalis*. Dependiendo del desarrollo del árbol y las condiciones de crecimiento para la poda de los árboles se llevó a cabo aproximadamente de 3 a 5 semanas antes de que un conjunto de árboles se usó para un experimento. Además la mayoría de los frutos jóvenes se eliminaron de los árboles para estimular el desarrollo de nuevos brotes. Los árboles usados para los experimentos a principios del verano (experimentos 1 a 4) no se trataron para el control de la sarna en 2006. Los árboles usados en los experimentos posteriores después de la mitad del mes de julio se trataron con un esquema de azufre tan común para el huerto orgánico en el principio de temporada para retardar la epidemia de sarna, pero se dejó sin tratar al menos 3 semanas antes y durante los experimentos.

Se llevó a cabo una serie de 8 experimentos, cada uno en un conjunto diferente de los árboles. Para cada experimento de 2 a 6 árboles, dependiendo del número de brotes recién producidos por árbol, se eligieron para cada uno de los 6 bloques (repeticiones). Dentro de cada bloque, 7 tratamientos se llevaron a cabo. Para cada tratamiento (por duplicado) se usaron 3 brotes que se produjeron en la misma rama. Los brotes se marcaron con anillos de metal de colores de manera que las 2 hojas más jóvenes completamente expandidas en el día del primer tratamiento más tarde podrían distinguirse de las otras hojas del brote. Los tratamientos consistieron en la atomización de agua del grifo que contiene 0.01% de Tween 80 como control, o suspensiones de esporas recién producidas del antagonista *C. cladosporioides* H39. Los tratamientos separados se llevaron a cabo con esporas producidas del fermentador formuladas como polvos secos y resuspendidas en agua del grifo que contiene 0.01% de TWEEN 80. Las aplicaciones de atomización se hicieron usando un atomizador de mochila impulsado por aire comprimido a 250 kPa. Los diferentes experimentos se llevaron a cabo en el período entre el 22 de junio y el 28 de septiembre de 2006. Los experimentos comenzaron con el primer tratamiento 1 a 3 días después de que un período de infección de *V. inaequalis* había sido predicho de acuerdo con la tabla Mills basado en la duración de la humedad de la hoja y temperatura. Las fechas de inicio de los 8 experimentos fueron 22 Junio y 29 de Junio, 06 de Julio, 31 de Julio, 3 de Agosto, 7 de Agosto, 21 Agosto, 24 de Agosto y el 24 de Agosto de 2006. En el experimento 8 el período entre el período de infección esperado y la primera aplicación se prolongó a 10 días, pero las hojas ya se marcaron de 1 a 3 días después del período de infección esperado como en los otros experimentos. Durante todos los experimentos, los tratamientos posteriores se llevaron a cabo a intervalos de 3 a 4 días. En el principio del experimento 3, se muestrearon las hojas 18 días después del primer tratamiento (y por lo tanto 19 a 21 días después de un período de infección esperado). En los experimentos 4-7, las hojas se muestrearon 24 a 25 días después del primer tratamiento (y así 25 a 28 días después de un período de infección esperado) para aumentar el período de tiempo de esporulación de *V. inaequalis* y para posibles interacciones antagónicas. En el experimento 8, las hojas se muestrearon 24 días después de la primera aplicación y así, 34 días después del período de infección esperado.

En cada experimento, las 2 hojas más jóvenes totalmente expandidas al principio en el experimento junto con las 2 hojas siguiente más jóvenes (expandidas durante el curso de los experimentos) se mezclaron para los 3 brotes que pertenecen a la misma réplica de manera que una muestra consistió en 12 hojas ('hojas jóvenes'). Del mismo brote, las próximas 3 a 12 hojas más viejas, dependiendo del tamaño del brote, además se muestrearon y mezclaron de manera que las muestras consistieron de 9 a 36 hojas ('hojas viejas'). El número promedio de hojas viejas muestreadas en los diferentes experimentos fue 21.8. Las muestras de hojas jóvenes se colocaron en frascos de vidrio de 250 ml. Dentro de 2 h, se añadió de 100 - 150 ml (dependiendo de la cantidad de hojas) de agua del grifo con 0.01% de Tween 80 y los frascos se agitaron con un agitador de frasco a 700 OCS min⁻¹ durante 10 min. Las muestras de las hojas más viejas se procesaron de la misma manera usando frascos plásticos de 1000 ml con 150 - 350 ml (dependiendo del número de hojas) de agua del grifo añadidas antes de agitar. De las suspensiones obtenidas, submuestras de 6 ml se almacenaron a -18 °C. La concentración de conidias de *V. inaequalis* se determinó para cada suspensión con la ayuda de un hemocitómetro. La superficie foliar de todas las hojas por muestra se midió con un medidor de área.

Estadísticas

El número de conidia de *V. inaequalis* producido de hojas cm⁻² se calculó por réplica. Si no se detectaron conidias, un límite de detección se fijó en una conidia contado en la suspensión conidial, resultando en un límite de detección promedio para varios experimentos de aproximadamente 100 conidias cm⁻², por ejemplo, en el intervalo, dependiendo de las superficies foliares para las diversas réplicas, entre 74 y 212 cm⁻² durante los 3 primeros experimentos llevados a cabo bajo condiciones controladas.

Los datos obtenidos para 2 edades de hojas diferentes se transformaron en logaritmo natural y analizaron por separado por edad de la hoja por ANOVA. Los experimentos conducidos bajo condiciones controladas se analizaron por separado comparando las medias de los tratamientos de control y los tratamientos con los antagonistas individuales usando pruebas LSD no protegidas ($\alpha = 0.05$). Desde que los valores P de ANOVA frecuentemente fueron mayores que P = 0.05, no se hicieron otras comparaciones múltiples entre los tratamientos con los antagonistas (Ott y Longnecker, 2001). Para los experimentos de campo, los datos transformados en logaritmo natural obtenidos de 2 edades diferentes de hojas se analizaron por separado por edad de la hoja mediante ANOVA con un diseño de bloque, con experimentos individuales considerados como bloques principales y tratamientos se aleatorizaron dentro de los 6 bloques replicados

de cada experimento. Se indicaron los efectos del tratamiento estadísticamente significativos (pruebas LSD protegida; $\alpha = 0.05$).

Resultados

Aislamiento de los hongos a partir de las colonias de *V. inaequalis* pre-tamizaje El crecimiento de hongos diferentes de *V. inaequalis* se observó frecuentemente en colonias del patógeno que esporulan y se obtuvieron varios cientos de aislados fúngicos. Los aislados se agruparon de acuerdo con la apariencia de las colonias y en total 148 aislados que representan varios tipos de colonias se probaron en la preselección. 131 de los 148 aislados produjeron más de 1×10^5 esporas o células de levadura por placa y se cultivaron a diferentes temperaturas y potenciales de agua. A partir de estos 131 aislados restantes, todos fueron capaces de crecer a 5°C ; 16 no crecieron a -10°C . 14 crecieron a 36°C , de las cuales 1 aislado no creció en WP = -10°C . Dado que muchos de tales aislados con la combinación preferida de las características pertenecieron a *Cladosporium* spp., sólo un subconjunto de los aislados seleccionados aleatoriamente de este grupo se probó en las plántulas. En total, 63 de los 102 aislados se probaron además en bioensayos en plántulas de manzano.

Pruebas de plántulas

Catorce experimentos en plántulas se llevaron a cabo. En los tratamientos de control de los primeros 5 experimentos, la producción de conidia en las cinco hojas más jóvenes de la plántula fue en promedio de $3596 \text{ conidias cm}^{-2}$ y el intervalo de los diferentes experimentos entre 1339 y $10509 \text{ conidias cm}^{-2}$ (valores retrotransformados). Dado que la producción de conidia fue alta en la hoja más joven y mucho menos en las hojas añosas se decidió muestrear tales hojas por separado en los experimentos posteriores. En el experimento 6 - 14, la conidiación promedio en la hoja joven fue $2896 \text{ conidias cm}^{-2}$ y el intervalo para los diferentes experimentos entre 728 y $6186 \text{ conidias cm}^{-2}$ (valores retrotransformados). Para hojas añosas, la conidiación promedio fue $453 \text{ conidias cm}^{-2}$ y el intervalo para los diferentes experimentos entre 144 y $1313 \text{ conidias cm}^{-2}$ (valores retrotransformados). La variación en conidiación no sólo fue alta entre los experimentos, sino también dentro de los experimentos entre los conjuntos de réplicas de plántulas.

La mayoría de los 80 candidatos aislados que se probaron en las plántulas no redujo significativamente la conidiación de *V. inaequalis*. Un aislado, de *C. cladosporioides* H39 causó una reducción significativa de *V. inaequalis* en las hojas jóvenes o añosas que se repitieron en posteriores experimentos independientes. Sin embargo, las eficacias (calculado sobre la base de los valores retrotransformados de las hojas jóvenes) de este antagonista varió entre 55 a 79 % para *C. cladosporioides* H39 en los experimentos en los que se probó y la reducción de la conidiación conidia fue en algunos casos estadísticamente no significativa (Tabla 1). Muy pocos aislamientos mostraron un fuerte efecto antagonista estadísticamente significativo en un experimento pero tales efectos no se pudieron repetir. Tales aislados pertenecían a *A. pullulans*, *C. cladosporioides*, *P. pinodella*, y *Cladosporium* spp. En ningún caso se observó mejorías significativas en la conidiación de *V. inaequalis* después de la aplicación de los candidatos aislados.

Prueba de huerto 2006

La sarna del manzano desarrollada moderadamente en el huerto antes del primer experimento se inició el 22 de Junio. En junio y primera quincena de julio, las condiciones secas acompañado con temperaturas día frecuentemente superiores a 30°C no fueron favorables para el desarrollo adicional de la sarna del manzano. Después de eso, el clima lluvioso y frío fue muy favorable para la sarna del manzano hasta el final de los experimentos.

Durante los 3 primeros experimentos realizados en condiciones secas y cálidas, $2.1 \text{ a } 12.8 \times 1000 \text{ conidias cm}^{-2}$ (valores retrotransformados) se encontraron en las hojas jóvenes y $9.5 \text{ a } 40.3 \times 1000 \text{ conidias cm}^{-2}$ en las hojas añosas en parcelas control tratadas con agua (Tabla 2 A, B). Después de que el tiempo cambió a la quincena de julio de condiciones húmedas y frías, $46.3 \times 1000 \text{ conidias cm}^{-2}$ en las hojas jóvenes y $9.8 \times 1000 \text{ conidias cm}^{-2}$ se encontraron en las hojas de los tratamientos de control en el experimento 4. Durante los experimentos posteriores los números de conidias aumentaron a $227.3 \times 1000 \text{ conidias cm}^{-2}$ en hojas jóvenes y $132.1 \text{ conidias cm}^{-2}$ en las hojas añosas en el experimento 8.

La viabilidad de las esporas aplicadas en las fechas de aplicación 25 durante el transcurso de la serie de experimentos se evaluó para cada suspensión en una placa de agar atomizada en el campo. La viabilidad de *Cladosporium* sp. H39 fue 92 % (en el intervalo de 82 a 99 %). Las esporas formuladas de *C. cladosporioides* H39 tuvieron una viabilidad de aproximadamente 47% al inicio de los experimentos. Cuando se prepararon suspensiones de esporas para aplicaciones de campo, las esporas formuladas de *C. cladosporioides* H39 formaron agrupamientos que consisten en aproximadamente 5 a 50 esporas en las suspensiones atomizadas de modo que no fue posible una determinación precisa de la germinación de esporas. La mayoría de los agrupamientos de las suspensiones atomizadas en las aplicaciones 11 mostraron crecimiento de hongos. Sólo unos agrupamientos de esporas aplicados entre el 10 de agosto y el 29 de agosto mostraron el crecimiento de hongos. Se puede asumir que las esporas formuladas almacenadas que se usaron, perdieron su vigor durante el almacenamiento de los últimos tratamientos durante el experimento 4 y todos los tratamientos durante los experimentos 5 y 6. A partir de finales de agosto en lo adelante, se usó un nuevo lote de esporas formuladas de los cuales la mayoría de los agrupamientos de esporas mostró el crecimiento de hongos. No se

encontraron efectos significativos de los tratamientos cuando se analizaron los datos para cada experimento por separado. Para un análisis general, se excluyeron los experimentos 1, 5 y 6 debido a que no estaba disponible el formulado viable de *C. cladosporioides* H39 durante el experimento 1 y la viabilidad fue baja durante estos experimentos 5 y 6. Una reducción significativa del número de conidias cm^{-2} se encontró para los tratamientos con formulado *C. cladosporioides* H39 tanto en hojas jóvenes como añosas (Tabla 2 B). En promedio, la producción de conidia se redujo en un 42% en las hojas jóvenes y en 38% en las añosas. Se encontró una tendencia de este tipo durante el primero de 3 experimentos realizados bajo la presión de enfermedad inferior, así como durante los últimos 2 experimentos realizados bajo presión de enfermedad extremadamente alta. Las esporas no-formuladas del aislado no redujeron la conidiación de *V. inaequalis*. Cuando la formulación de *C. cladosporioides* H39 se aplicó conteniendo sólo unas pocas o incluso ninguna conidia viva, durante los experimentos 5 y 6, ninguna tendencia se encontró de que la propia formulación tuviera algún efecto en la reducción de la conidiación (Tabla 2 A).

Ejemplo 2 Prueba de huerto 2007

15 Materiales y Métodos

Inóculo fúngico

20 *Cladosporium cladosporioides* H39 se produjo como en el Ejemplo 1. El producto formulado contenía 2.0×10^9 esporas g^{-1} con una viabilidad de 20%. Durante el experimento, el lote de formulado H39 se almacenó a 4 °C en la oscuridad en bolsas de plástico. Las suspensiones se hicieron mediante la adición de los gránulos formulados en agua con Tween (0.01%) y agitando sin pretratamientos adicionales. La concentración final fue de 1×10^7 esporas ml^{-1} , equivalente a 2×10^6 esporas viables ml^{-1} .

25 Esporas de *Cladosporium cladosporioides* R406 se produjeron en placas de Petri sobre agar de harina de avena (20 g de harina de avena, 15 g de agar, 1000 ml de agua del grifo) a 20 °C con 12 hrs de luz negra por día. Después de 2 semanas de incubación, las esporas se suspendieron en agua del grifo que contiene 0.01% de Tween 80 y se añadieron a las placas. La suspensión se filtró a través de gasa (malla de 200 μm) para eliminar las células miceliales y el número de esporas se contó usando un hemocitómetro. Los rendimientos de espора fueron $8 - 30 \times 10^8$ esporas por placa de agar (90 mm de diámetro) con una viabilidad promedio de 93%, en el intervalo de 73 y 97% para las suspensiones preparadas en diferentes fechas. La viabilidad de las esporas en las suspensiones aplicadas en el campo siempre se comprobó mediante la atomización de la suspensión en agar extracto de malta (1 g de extracto de malta, 15 g de agar, 1000 ml de agua del grifo, modificado con tetraciclina a 15 mg l^{-1} y estreptomycin a 100 mg l^{-1}) en la huerta y evaluó el porcentaje de esporas germinadas después de incubación a 18°C durante 24 h.

35 *Huerto*

El experimento se llevó a cabo en 3 filas de var. Jonagold dentro de un huerto manejado orgánicamente en Randwijk, Países Bajos. El objetivo del experimento era controlar la epidemia del verano de *Venturia inaequalis* (Vi) con aplicaciones del antagonista a partir de finales de junio. Por lo tanto, era esencial permitir un inicio de una epidemia de leve a moderada en los huertos durante la temporada primaria. El ritmo de las aplicaciones de azufre se previó de forma que las infecciones primarias por ascosporas podían ocurrir, pero la progresión de la epidemia podría controlarse. Ninguna de las aplicaciones de azufre se planificaron más tarde de finales de mayo. Las condiciones climáticas inusuales durante la temporada primaria de 2007 con un período de 4 semanas sin ninguna lluvia fue muy desfavorable para la liberación e infección de Vi ascospora. Después que el clima se hizo más favorable después de abril, una sarna del manzano epidémica leve se desarrolló hasta el inicio del experimento. Ninguno de los tratamientos de azufre se llevaron a cabo para reducir la progresión de la epidemia.

50 *Diseño experimental, tratamientos y evaluaciones*

El experimento se llevó a cabo en un diseño con 6 bloques, con 2 bloques en cada una de las filas de 3 árboles. Cada bloque consistió en 4 parcelas, cada una con 4 árboles. Entre parcelas, 2 árboles no tratados sirvieron como tampón. Los diferentes tratamientos se asignaron al azar a dichas parcelas. Se previó atomizar los 4 árboles de cada parcela en una tasa de 2 l por parcela dos veces por semana con los siguientes tratamientos: (1) agua de grifo modificada con Tween 80 (0.01%) como control; (2) suspensión de H39 formulado (2×10^6 esporas ml^{-1}); (3) suspensión de R406 formulado (2×10^6 esporas ml^{-1}). Las aplicaciones se llevaron a cabo dos veces por semana en 16 fechas entre el 28 de junio y 20 agosto usando un atomizador manual que funciona con aire comprimido (AZO, Edecon, E de Países Bajos) con un aguilón de 2 metros y una boquilla (Birchmeier helico saphir 1.2, 2F-0,6; presión de 250 kPa). Ya que las esporas formuladas de R406 no estaban disponibles al inicio del experimento, el tratamiento (3) se llevó a cabo con las esporas producidas recién en el laboratorio para cada aplicación. Las aplicaciones de R406 dos veces por semana se inició con un retraso el 12 de Julio de modo que el hongo se aplicó sólo en 12 fechas. Debido a que no se pueden producir suficientes esporas, sólo se seleccionaron y marcaron ramas obtenidas de múltiples atomizaciones en lugar de tratamientos de árboles enteros.

65 *Evaluaciones*

Producción de conidia. La producción de conidia se evaluó en las hojas jóvenes susceptibles desarrolladas en el transcurso del experimento en 3 fechas de muestreo para las hojas tratadas con agua-Tween como control, o suspensiones de conidia de H39 y en 2 fechas de muestreo para R406. Las fechas de muestreo se eligieron tal que los conjuntos de hojas susceptibles presentes durante un período de infección previsto se muestrearon aproximadamente 5 semanas después del período de infección. La tabla Mills basado en la duración humedad foliar y temperatura se usó para predecir los períodos de infección. Para cada muestreo, la segunda hoja más joven apenas desarrollada se marcó 1 a 3 días después de un período de infección previsto en un conjunto de 3 ramas que pertenecen al mismo árbol en cada parcela. Después de 5 semanas, las 2 hojas apenas desarrolladas en la fecha de etiquetado y las otras 2 hojas más jóvenes, desarrolladas después del etiquetado, se muestrearon lo que resulta en una muestra que consiste en 12 hojas por parcela. Las muestras de hojas se pusieron en frascos de vidrio de 250 ml. En 2 h, 100 - 150 ml (dependiendo de la cantidad de hojas) de agua del grifo con Tween 80 al 0.01% se añadió y los frascos se agitaron con un agitador de frascos (Stuart Scientific SF1, Reino Unido) a 700 OCS min⁻¹ durante 10 min. De las suspensiones obtenidas, submuestras de 6 ml se almacenaron a -18 °C y la concentración de conidia de *Vi* se determinó después de cada suspensión con la ayuda de un hemocitómetro. La superficie foliar de todas las hojas por muestra se midió con un medidor de área (Li-COR Biosciences, modelo 3100, Lincoln, EE.UU.).

Las fechas de muestreo fueron 6 de agosto (de hojas marcadas en 2 de julio), 16 de agosto (de hojas marcadas en 12 de julio), y 20 de agosto (de hojas marcadas en 16 de julio).

Colonización epifítica y endofítica. Veinte hojas marcadas de los árboles tratados con agua-Tween (control) o suspensiones de esporas de H39 y de ramas tratadas con suspensiones de esporas de R406 se recogieron al 4 de octubre, de cada parcela. Todas las hojas muestreadas se desarrollaron en los árboles durante el período entre el 28 de junio y 20 de agosto, cuando las aplicaciones de atomización en serie se llevaron a cabo. Por lo tanto, se puede suponer que todas las hojas obtuvieron una o varias aplicaciones de esporas en las etapas del desarrollo joven.

De cada hoja, un disco de hoja (9 mm de diámetro) se cortó usando un perforador de corcho. Los 20 discos de hojas resultantes por muestra se agruparon en viales estériles de 50 ml que contienen 10 ml de agua-Tween (0.01%) estéril y viales se agitaron con un agitador de frasco a alta velocidad (700 OCS min⁻¹) durante 10 min. De las suspensiones resultantes, se prepararon diluciones seriadas (1:10) y 100 µl de suspensiones diluidas y sin diluir se sembraron en cada uno de 2 placas de agar que contienen agar malta (10 g de extracto de malta, 15 g de agar, 1000 ml de agua del grifo) modificado con 100 mg l⁻¹ de estreptomycin y 15 mg l⁻¹ de tetraciclina. Las placas se incuban a 20 °C en la oscuridad y colonias de *Cladosporium* spp., otras hifas de hongos y levaduras se contaron después de 4, 7 y 11 días. A partir de los recuentos de colonias, el número de unidades formadoras de colonias (UFC) cm⁻² de superficie foliar se calculó para cada muestra.

Después de agitar los discos de hojas para eliminar los hongos epifíticamente presentes, los 20 discos de hoja mezclados por muestra se esterilizaron en la superficie y homogeneizaron en 5 ml de agua estéril utilizando un mortero. Para la esterilización superficial, los discos de hojas se sumergieron en etanol 96% seguidos por inmersión durante 1 minuto en hipoclorito de sodio 0.5% y posteriormente se enjuagaron 3 veces con agua estéril. A partir de los homogeneizados resultantes se prepararon diluciones en serie (1:10) en agua estéril y 100 µl de suspensiones diluidas y sin diluir se sembraron en cada una de las 2 placas de agar malta que contienen 100 mg l⁻¹ de estreptomycin y 15 mg l⁻¹ de tetraciclina. Las placas se incubaron y las colonias de hongos endófitos se evaluaron como descrito anteriormente.

Estadísticas

El número de conidia *Vi* producidos por cm⁻² de superficie foliar se calculó por muestra réplica. Los valores transformados en logaritmo natural del tratamiento de control se compararon con los tratamientos antagonistas individuales por separado para ambas edades de hoja mediante una prueba LSD de un solo lado desprotegida ($\alpha = 0.05$). Los números transformados en logaritmo de UFC por cm⁻² de superficie foliar se analizaron por ANOVA seguido de pruebas-LSD de dos lados ($\alpha = 0.05$).

Resultados

Las condiciones climáticas durante el período de los experimentos con lluvias frecuentes y temperaturas moderadas fueron muy favorables para la sarna del manzano. Al inicio de los experimentos sólo síntomas ligeros estuvieron presentes en los huertos. Al final se observaron síntomas pesados de sarna en las hojas de los árboles dentro de las parcelas experimentales y en la vecindad.

Las esporas de R406 producidas recientemente para cada fecha de aplicación tuvieron altas tasas de germinación, generalmente por encima de 80% (Tabla 3). Las esporas formuladas de H39 germinaron para 20 - 30% durante las primeras semanas del experimento, pero la germinación se redujo a 4-16 % en los últimos 4 tratamientos. El alto valor excepcional para la germinación de esporas del 76% en la primera fecha de la atomización puede explicarse por la variación experimental debido al pequeño tamaño de la muestra de tan sólo 1 placa atomizada en condiciones de huerto.

En las hojas muestreadas al 6 de agosto, 16 de agosto y 20 de agosto a partir de árboles tratados con agua, 77,200 (13,900 a 139,800), 45,300 (35,200 a 55,200) y 32,200 (8,800 a 111,800) conidias cm^{-2} se produjeron en promedio (medias retrotransformadas, intervalo de 6 réplicas entre paréntesis; Fig. 2). La variación entre repeticiones por lo tanto se consideró alta. En las hojas de los árboles tratados con H39, el número de esporas menor fue estadísticamente significativo con 24,200 conidias cm^{-2} (reducción de 69%) en la primera fecha de muestreo y 22,000 conidias cm^{-2} (reducción del 51%) en la segunda fecha de muestreo. Para la última fecha de muestreo, no se observó ningún efecto del tratamiento para H39. Para las fechas de muestreo donde las hojas tratadas con R406 estuvieron disponibles, los recuentos de conidias en 16 de agosto fueron 24,300 conidias cm^{-2} de hojas tratadas con R406 que resultan en una reducción estadísticamente significativa de conidias en 46 %. Al 20 de agosto sólo se observó una reducción en 15% y el recuento no se diferenció del tratamiento de control.

No se observaron efectos del tratamiento sobre el desarrollo de la hoja o síntomas de fitotoxicidad.

Cerca de la caída de la hoja, la colonización endo- y epifítica de las hojas se evaluó mediante el sembrado en agar de lavados de la hoja y homogeneizados de hojas de superficie esterilizadas y el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). La colonización endofítica por *Cladosporium* spp. fue significativamente mayor y la colonización epifítica por *Cladosporium* spp. tendió a ser superior para las hojas que se trataron con H39 durante el verano. La colonización endo y epifítica de hojas tratadas con H39 por otros hongos hifas tendió a ser inferior en comparación con las hojas sin tratar. La colonización epifítica por levaduras fue significativamente inferior para las hojas tratadas con H39.

Ejemplo 3 Prueba de campo 2005/2006

Materiales y Métodos

Diseño experimental y tratamientos

En otoño de 2005, 25 aislados fúngicos pertenecientes a diferentes especies, incluyendo *Cladosporium cladosporioides* R406 se aplicaron en las hojas del manzano de un huerto manejado orgánicamente en Randwijk, Países Bajos, y las hojas tratadas se colocaron en el suelo del huerto hasta primavera siguiente. La selección de candidatos se basó en los resultados del pre-tamizaje llevado a cabo en la viabilidad económica y los posibles riesgos (ver ejemplo 1). Las esporas del aislado R406 se produjeron en agar de harina de avena (28 días de incubación a 18°C). Las suspensiones de esporas (500 ml por aislado) se prepararon inundando los cultivos en agar con agua estéril que contiene Tween 80 al 0.01%. Después de frotar suavemente con una espátula de goma para eliminar las esporas de los cultivos de hongos, las suspensiones se filtraron a través de gasa de nailon estéril con una malla de 200 μm . Las concentraciones de las suspensiones se determinaron con la ayuda de un hemocitómetro y se ajustaron a 2×10^6 esporas ml^{-1} . Las aplicaciones de atomización se realizaron usando atomizadores manuales que funcionan con aire comprimido. Las hojas de brotes de extensión se recogieron de los árboles al 17 de octubre para llevar a cabo las aplicaciones de atomización bajo condiciones controladas en un compartimiento del invernadero. Durante el período comprendido entre recoger las hojas y de nuevo fijar las hojas en mallas en el suelo del huerto, las hojas se almacenaron a 5 °C. Las hojas se fijaron en mallas, cada una con 40 hojas seleccionadas al azar, al 18 y 19 octubre. Al 20 de octubre 4 mallas con hojas por réplicas de cada tratamiento se atomizaron con suspensiones de esporas o agua con aproximadamente 20 ml de las suspensiones (o agua en los tratamientos de control) en ambos lados. Dos de las mallas, cada una con 40 hojas, se destinaron para la determinación del potencial de producción de ascosporas de *V. inaequalis*, las otras dos mallas para la determinación de densidades de población de *V. inaequalis* por TaqMan-PCR. Después de las aplicaciones, las hojas se secaron de nuevo dentro de aproximadamente 30 min. Las mallas con hojas tratadas se fijaron en el suelo del huerto en 21 de octubre sobre la tierra desnuda dentro de la huerta orgánica en Randwijk. Hubo 6 bloques (réplicas) en diferentes filas del huerto.

Cada suspensión de esporas se atomizó después sobre una placa de agar (agar de malta 1/10). Las placas se incubaron a 18 °C durante 2 días y se determinó la tasa de germinación. Las esporas de R406 tuvieron una viabilidad de >90%.

Evaluaciones

En los días 23, 24, 25, 30 y 31 de enero de 2006, respectivamente, las mallas de las réplicas 1-6 destinadas a la cuantificación de densidades de población de *V. inaequalis* por TaqMan-PCR se recogieron en el huerto, enjuagaron cuidadosamente con agua del grifo para eliminar la tierra adherida y se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente. Los residuos foliares de las 2 mallas por réplica de cada tratamiento se retiraron de las mallas, cortaron en piezas de 1 a 2 cm y una muestra de 5-10 g se liofilizó y posteriormente se pulverizó en un molino de laboratorio con una malla tamiz de 1-mm. Las muestras en polvo se almacenaron a -18°C. Se extrajo el ADN y se cuantificó el ADN de *V. inaequalis* por PCR en tiempo real especie-específico (TaqMan-PCR).

El 20 de marzo (bloque A), 22 de marzo (bloque B), 27 de marzo (bloque C), 29 de marzo (bloque D), 3 de abril (bloque E), y 5 de abril (bloque F), las mallas se recogieron en el huerto para cuantificar el potencial de producción de

ascosporas después de la extracción de ascosporas por burbujeo de aire en el agua. Los residuos foliares de las 2
 5 mallas por réplica de cada tratamiento se secaron al aire (20 °C, 70% HR, 2 días) y se determinó el peso. Posteriormente, una sub-muestra de 7-17 g máximo de residuos foliares secadas al aire de cada muestra se extendió
 en una bandeja de plástico sobre papel de filtro húmedo. Las bandejas se cubrieron con una bolsa plástica y se
 incubaron los residuos foliares en estas cámaras húmedas durante 7 días a 20 °C en la oscuridad seguido de 14 días a
 20 °C con 12 horas de luz por día para permitir la maduración (de una fracción sustancial) de ascos.

Diferentes salas de clima se usaron para la incubación, pero las hojas pertenecientes al mismo bloque se incubaron
 10 siempre en la misma habitación.

Después de la incubación, los residuos foliares se transfirieron en frascos plásticos de 1000 ml que contienen 150-350
 ml de agua dependiendo de la cantidad de residuos foliares. Se burbujeó aire (250 l por h) a través del agua lo que
 resulta en una turbulencia pesada durante 2 h. Después de eso, la suspensión resultante se pasó a través de un tamiz
 15 (malla de 1 mm) para eliminar los residuos foliares. Dos sub-muestras (8 ml) de la suspensión se almacenaron a -20
 °C. La concentración ascosporas en las suspensiones se determinó microscópicamente usando un hemocitómetro. La
 producción de ascosporas se expresó como la producción por 80 hojas (originalmente fijadas en el suelo del huerto en
 otoño) o por g de residuo foliar secado al aire presente en la fecha de muestreo en primavera. La producción de
 ascosporas por 80 hojas es un resultado del posible efecto del tratamiento sobre la descomposición y la producción de
 ascosporas.

Estadísticas

Los datos obtenidos para los números de ascosporas se transformaron a logaritmo ($\log_{10}$). Todos los datos se
 analizaron por ANOVA. Las medias de los tratamientos de control y tratamientos de antagonistas individuales se
 25 compararon usando pruebas LSD ($\alpha = 0.05$). Desde que los valores p de ANOVA fueron frecuentemente mayores que $P = 0.05$, no se hicieron comparaciones múltiples adicionales entre los tratamientos antagonistas.

Resultados

La cantidad de ADN de *V. inaequalis* se cuantificó en los residuos foliares muestreados al final de enero de 2006 por
 30 PCR en tiempo real (TaqMan-PCR) usando un par de iniciadores especie-específico y sonda. La cantidad total de ADN-
V. inaequalis se calculó en los residuos totales que quedaron de 80 hojas. Los residuos foliares tratados con
Cladosporium cladosporioides R406 tuvieron significativamente menos ADN-*V. inaequalis* comparado con el control sin
 tratar (Tabla 6).

El número de ascosporas producidas en las hojas en primavera fue alto, con un promedio de 7.5×10^5 (valores
 retrotransformados) para los residuos de 80 hojas del tratamiento de control (Tabla 7). Por g de residuo foliar, se
 produjeron 3.4×10^4 ascosporas en el tratamiento de control (Tabla 8). Para los residuos foliares tratados con aislado de
Cladosporium cladosporioides R406 los recuentos ascosporas fueron aproximadamente 70% más bajos. Estas
 40 diferencias entre el tratamiento de control y tratamiento con R406 fueron estadísticamente significativamente tanto para
 el número de ascosporas producidas en los residuos de 80 hojas como para el número de ascosporas producidas por g
 de residuo foliar (Tablas 7 & 8). Ningún otro tratamiento con diferentes antagonistas candidatos tendieron a causar una
 reducción de ascosporas.

Ejemplo 4 Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la producción de conidia de *Venturia inaequalis* en
 45 condiciones de huerto

Objetivo

Aplicaciones de la conidia del antagonista *C. cladosporioides* H39, formulado en piloto como gránulos dispersables en
 agua (WG), redujeron la producción de conidia del patógeno sarna del manzano *Venturia inaequalis* en condiciones de
 huertos en los experimentos llevados a cabo en condiciones 2006 y 2007 (ver Ejemplo 1 y 2). El objetivo del
 experimento llevado a cabo en 2008 fue confirmar estos resultados en otra temporada y para obtener la primera visión
 55 en el mejor ritmo de las aplicaciones antagonistas después de los períodos de infección previstos para *V. inaequalis*.

Producción de conidia de H39

Para aplicaciones en el huerto, las conidias de *C. cladosporioides* H39 se produjeron en un sistema de fermentación de
 estado sólido (SSF) por PROPHYTA Biologischer Pflanzenschutz GmbH, Alemania. Las conidias cosechadas se
 60 formularon como un gránulo dispersable en agua (WG). Para la preservación de la calidad del producto, el producto final
 se almacenó a 4 °C. La viabilidad de la conidia seca se determinó sobre agar extracto de malta (1 g extracto de malta l⁻¹)
 antes del inicio del experimento de campo. Las conidias incubadas durante 24 horas a 20 °C con tubos germinales
 más largos que la mitad del diámetro mínimo de un conidio se consideraron que eran viables.

Ensayo de huerto

El experimento se llevó a cabo en el huerto manejado orgánicamente en Investigación Aplicada a Plantas, Randwijk, Países Bajos en los árboles de 8 años de edad cv Jonagold. El objetivo del experimento era controlar la epidemia del verano de sarna del manzano con las aplicaciones antagonistas. Por lo tanto, era esencial permitir un inicio de una epidemia en el huerto durante la temporada primaria. Condiciones climáticas durante la temporada primaria de 2008 favorecieron el desarrollo de la sarna y se encontraron muchos de los síntomas de la sarna en el huerto al inicio de junio. Un evento de granizo severo dañó seriamente el huerto, el 22 de junio. El 24 y 26 de junio, se aplicó Topsin-M (a.i. 500 g de metil tiofanato l⁻¹, Certis Europe B.V., Maarsen, Países Bajos) en la tasa de 140 ml por 100 litros de agua (aplicado en 1000 l ha⁻¹) en todo el huerto y los huertos vecinos para prevenir infecciones del cancro europeo del árbol frutal (*Nectria galligena*). No se llevaron a cabo tratamientos fungicidas adicionales para reducir la progresión de la epidemia antes o durante el experimento. Durante las siguientes semanas, los árboles produjeron abundantes nuevos brotes con hojas nuevas. Tales hojas recién formadas, sin daños por el granizo o alcanzadas por las atomizaciones de fungicidas, se usaron en el experimento.

El experimento se dispuso en un diseño con 6 bloques, con 2 bloques en la misma fila de árboles. Cada bloque consistió en 3 parcelas, cada una con 4 árboles. Entre parcelas, 2 árboles no tratados sirvieron como tampón. Los siguientes 3 tratamientos diferentes se asignaron aleatoriamente a las parcelas: (1) sin tratar como control; (2) suspensión de conidia de H39 formulado (2 x 10⁶ conidia viable ml⁻¹; 2 l por parcela). El aerosol aditivo Trifolio S- forte (Trifolio-M GmbH, Lahnau, Alemania) se añadió a la suspensión en una tasa de 2 ml l⁻¹ para mejorar la capa de aerosol sobre la superficie foliar. Las aplicaciones quincenales de H39 se llevaron a cabo en los días 22 de julio, 24 de julio, 28 de julio, 31 de julio, 05 de agosto, 07 de agosto, 11 de agosto y 18 de agosto. (3) El tercer tratamiento consistió en la aplicación semanal de azufre (Thiovit-Jet, Syngenta Crop Protection BV, Roosendaal, Países Bajos; a.i. 80 % de azufre) en una tasa del 0,4% (400 gramos por 100 litros de agua a 1000 l ha⁻¹). Los tratamientos de azufre se aplicaron a los días 22 de julio, 28 de julio, 5 de agosto y 11 de agosto.

El número de hojas con sarna y el número de manchas con sarna por hoja se evaluaron para las hojas de 10 brotes de cada uno de los 4 árboles por parcela antes del experimento iniciado en 11 de junio. En total 227 a 239 hojas se examinaron por parcela. Al 19 de septiembre, los síntomas de la sarna se evaluaron en 177 a 232 hojas por parcela que se produjeron después del inicio del experimento. La gravedad de la enfermedad (% de superficie foliar cubierta con síntomas de la sarna) se estimó usando siguientes clases.: 1: sin sarna; 2: cobertura del 1-10%; 3: cobertura del 11 - 50%; y 4: cobertura del 51 - 100%. Un índice de gravedad se calculó usando la fórmula:

$$DS = (0 \times N_1 + 1 \times N_2 + 2 \times N_3 + 3 \times N_4) / N_{\text{total}} * 100$$

En la que N₁, N₂, N₃, y N₄ es el número de hojas agrupadas en las clases 1, 2, 3, y 4, respectivamente, y N_{total} es el número total de hojas evaluadas por parcela.

La producción de conidia de *V. inaequalis* se evaluó en las hojas jóvenes susceptibles desarrolladas durante el curso del experimento en las 3 fechas de muestreo. Las fechas de muestreo se eligieron tal que los conjuntos de hojas susceptibles presentes durante un período de infección previsto se muestrearán aproximadamente 5 semanas después del período de infección. La tabla Mills basado en la duración humedad foliar y temperatura se usó para predecir los períodos de infección. La segunda hoja más joven apenas desarrollada se marcó 1 a 3 días después de un período de infección previsto en un conjunto de 3 ramas que pertenecen al mismo árbol en cada parcela. El período entre la infección prevista y primera aplicación de *C. cladosporioides* H39 así como el número de atomizaciones y período de protección por atomizadores se diferenciaron por fecha de muestreo (Fig. 3). Después de 35 días, las 2 hojas recién desarrolladas en la fecha del etiquetado y las próximas 2 hojas más jóvenes, desarrolladas después del etiquetado, pero expandidas durante el curso del experimento, se muestrearán lo que resulta en una muestra que consiste en 12 hojas por parcela. Las fechas de muestreo fueron 22 de agosto (de hojas etiquetadas en 18 de julio), 26 de agosto (de hojas etiquetado en julio 22), y el 04 de septiembre (de hojas etiquetadas en agosto 01). Las 12 hojas por muestreo se agruparon y colocaron en botellas de vidrio de 250 ml. En 2 h, 100 - 150 ml (dependiendo de la masa foliar) de agua del grifo con Tween 80 al 0.01% se añadió y las botellas se agitaron con un agitador de frascos a 700 OCS min⁻¹ durante 10 min. A partir de las suspensiones obtenidas, sub-muestras de 6 ml se almacenaron a -18 °C. La concentración de conidia de *V. inaequalis* se determinó para cada suspensión con la ayuda de un hemocitómetro. La superficie foliar de todas las hojas por muestra se midió con un medidor de área.

Resultados y discusión

Conidia de *C. cladosporioides* H39 producido en la primavera de 2008, formulado como un gránulo dispersable en agua siguiendo el protocolo experimental y se almacenó a 5 ° C tenía una viabilidad de 65% al inicio de los experimentos. La viabilidad se mantuvo estable hasta el final del experimento.

Antes de iniciarse el experimento, la incidencia de la sarna en las hojas no se diferenció del de las parcelas que pertenecen a los diferentes tratamientos. La incidencia media fue de 81.7% en parcelas usadas como control, 84.6% para parcelas tratadas después con H39, y 84.3% para las parcelas tratadas con azufre más tarde. Además el número

de manchas foliares por hoja no se diferenciaron estadísticamente, por lo que se puede suponer que el desarrollo de la sarna fue similar en las diferentes parcelas antes del inicio del experimento.

En las hojas muestreadas el 22 de agosto, 26 de agosto y 04 de septiembre a partir de árboles no tratados 35,242 (11,447 a 74,870), 30,242 (18,926 a 59,497) y 32,533 (19,698 a 46,350) conidias de *V. inaequalis*·cm² de superficie foliar se produjeron en promedio (medias retrotransformadas, en el intervalo de 6 réplicas entre paréntesis) (Fig. 4). En las hojas de los árboles tratados con *C. cladosporioides* H39, el número de esporas fue estadísticamente significativamente inferior con 11,499 conidias de *V. inaequalis*·cm² de superficie foliar (reducción del 67% basada en valores retrotransformados) en la primera fecha de muestreo y 15,139 conidias·cm² de superficie foliar (reducción del 50%) en la segunda fecha de muestreo. Para la última fecha de muestreo, ningún efecto significativo se observó para las aplicaciones de *C. cladosporioides* H39 con 21,163 conidias·cm² de superficie foliar (reducción del 35%) en las hojas tratadas. Las aplicaciones de azufre resultaron en una reducción del número de conidias de *V. inaequalis* producidas por cm² de superficie foliar en un 2, 16 y 26 % para las diferentes fechas de muestreo (Fig. 4). La gravedad de la sarna, evaluada en el 19 de septiembre, un mes después del último tratamiento con H39, fue de 2.2 para el tratamiento de control, pero estadísticamente significativamente inferior con 1.8 para parcelas tratadas con H39 (Fig. 5). En las parcelas tratadas con azufre, la gravedad de la sarna fue 2.0, que no se diferencia significativamente de los otros tratamientos.

Durante el experimento de huerto las condiciones ambientales resultaron en un alto número de períodos de infección y se favoreció el desarrollo de la sarna. Además el desarrollo excepcional de nuevos brotes después del evento granizo apoyaron la epidemia de verano. Bajo una presión de enfermedad grave de ese tipo los tratamientos con azufre frecuentemente no son suficientes para lograr el control de la enfermedad como se encontró también en nuestro experimento. Los tratamientos con el antagonista H39 redujeron la producción de conidias de *V. inaequalis* bajo tales condiciones severas, lo que confirma los resultados de experimentos de huerta realizados en 2006 y 2007. El efecto más fuerte se encontró para la primera fecha de muestreo cuando los tratamientos con H39 comenzaron después de la infección prevista pero se continuaron hasta 4 días antes del muestreo. Para la tercera fecha de muestreo, múltiples tratamientos con H39 sólo se llevaron a cabo antes del período de infección previsto pero el último tratamiento se aplicó 17 días antes del muestreo. En esta situación, la producción de conidias de *V. inaequalis* sólo se redujo en un 35 %. Dado que el efecto del antagonista puede depender también de factores ambientales que se diferencian ante las diferentes fechas de muestreo, se necesitan más datos de los experimentos de huerto repetidos antes se pueden extraer conclusiones sobre el ritmo óptimo de las aplicaciones del antagonista.

Por primera vez además se evaluó la gravedad de la sarna después de los tratamientos con el antagonista H39. La gravedad de la sarna reducida por el alto nivel de sarna observado en el huerto demostró que *C. cladosporioides* H39 tiene un alto potencial para el control de epidemias de sarna.

Ejemplo 5. Ensayo de Huerta en 2007/2008: Efecto de los tratamientos con *Cladosporium cladosporioides* H39 y R406 durante el verano en la producción de ascosporas de *Venturia inaequalis* en hojas tratadas después de hibernación

Objetivo

Tratamientos de hojas del manzano durante el verano con suspensiones de conidias de los antagonistas *Cladosporium cladosporioides* H39 y R406 condujeron a la reducción de la producción de conidia del hongo de la sarna *Venturia inaequalis* en las hojas del manzano tratadas bajo condiciones de huerto (ver Ejemplo 1 y 2).

El objetivo de una evaluación adicional realizada en las hojas tratadas en el huerto durante el experimento en 2007 fue estudiar el efecto de tales tratamientos de hojas recién desarrolladas con los antagonistas durante el verano en la producción de ascosporas por *V. inaequalis* en hojas tratadas después de hibernación.

Diseño experimental. El experimento se llevó a cabo en el huerto manejado orgánicamente en Applied Plant Research, Randwijk, Países Bajos. El objetivo del experimento era evaluar el potencial de las aplicaciones de antagonista para controlar la epidemia de verano de la sarna del manzano y para reducir la carga de inóculo de *V. inaequalis* producida en la hibernación de las hojas del manzano. Por lo tanto, era esencial permitir un inicio de una epidemia de leve a moderada en los huertos durante la temporada primaria. Las condiciones climáticas inusuales durante la temporada primaria de 2007 con un período de 4 semanas sin ninguna lluvia fue muy desfavorable para la liberación e infección de *V. inaequalis* ascospora. El clima se hizo más favorable a partir de abril y una leve epidemia de la sarna del manzano se desarrolló cuando se aplicó la primera suspensión antagonista. No se llevaron a cabo tratamientos fungicidas para reducir la progresión de la epidemia antes o durante el experimento.

El experimento se llevó a cabo en los árboles de 8 años de edad cv Jonagold en un diseño con 6 bloques, con 2 bloques en la misma fila de árboles. Cada bloque consistió en 3 parcelas, cada una con 4 árboles. Entre parcelas, 2 árboles no tratados sirvieron como tampón. Los 3 tratamientos diferentes se asignaron al azar a las parcelas. Los árboles se trataron en una tasa de 2 l por parcela dos veces por semana con los siguientes tratamientos: (1) agua del grifo modificado con Tween 80 (0.01%) como control; y (2) la suspensión conidial de H39 formulado (2 x 10⁶ conidia ml⁻¹). Las solicitudes se llevaron a cabo dos veces por semana en 16 fechas entre el 28 de junio y 20 de agosto. (3) El

tercer tratamiento consistió en múltiples aplicaciones de atomización de suspensiones de conidia de *C. cladosporioides* R406. Conidias recién producidas en cada fecha de aplicación se aplicaron dos veces por semana en los 4 árboles de cada parcela réplica en 12 fechas entre el 12 de julio y 20 de agosto.

- 5 Producción de conidias de *V. inaequalis* durante el verano. El efecto de los tratamientos sobre la producción de conidias de *V. inaequalis* se indicó como en el Ejemplo 2.

10 Producción de ascosporas de *V. inaequalis* en hojas del manzano de hibernación. El 12 de julio de 2007 la segunda hoja más joven recién desarrollada se marcó en 25 ramas por parcela. En algunas parcelas pocas ramas estuvieron disponibles. El 4 de octubre de 2007, se tomaron muestras de las hojas que se desarrollaron recién en la fecha de etiquetado y las siguientes 2 hojas más jóvenes, desarrolladas después del etiquetado. En función de la disponibilidad de hojas en la fecha de muestreo, se recogieron 16 a 65 hojas por parcela. Las hojas muestreadas de cada parcela se pesaron y fijaron entre 2 mallas de hierro de tamaño 50 x 50 cm (malla de 15 x 20 mm) para que las hojas no se toquen entre sí. Mallas con hojas se colocaron en el suelo del huerto sobre la tierra desnuda dentro de las filas del manzano de la huerta orgánica en Randwijk y fijaron con clavos de metal para que la mayor superficie de la malla metálica tocara la tierra. Hubo 6 bloques (réplicas) y mallas que contenían hojas de diferentes tratamientos (aplicados durante el verano) que se distribuyeron al azar dentro de los bloques.

20 Al día 26 de febrero de 2008, se recogieron mallas. Se mezclaron los residuos foliares de ambas mallas por réplica, secaron al aire (20°C, 70% HR, 2 días) y pesaron. Posteriormente, los residuos foliares secados al aire de cada muestra se extendieron en bandejas de plástico por separado (50 x 30 x 6 cm) sobre papel de filtro húmedo. Las bandejas se cubrieron con una bolsa plástica y se incubaron los residuos foliares en estas cámaras húmedas durante 7 días a 20°C en la oscuridad seguido de 14 días a 20 °C con 12 horas de luz (75 µE) por día para permitir la maduración (de una fracción sustancial) de ascos. Después de la incubación, los residuos foliares se transfirieron en frascos plásticos de 25 1000 ml que contienen 150-350 ml de agua dependiendo de la cantidad de residuos foliares. El aire (250 l h⁻¹) se burbujeó a través del agua lo que resulta en una pesada turbulencia durante 2 h (Heye y otros 1981, Canadian Journal of Botany 59, 965-968; Phillion, 1995, Msc Thesis McGill University, Montreal, Canadá). Después de eso, la suspensión resultante se pasó a través de un tamiz (malla de 1 mm) para eliminar los residuos foliares. Dos sub-muestras (8 ml) de la suspensión se almacenaron a -20 °C. La concentración ascosporas en las suspensiones se determinó microscópicamente usando un hemocitómetro. La producción de ascosporas se expresó como la producción por g de 30 hojas (originalmente fijados en el suelo del huerto en otoño) o por g residuo foliar secado al aire presente en fecha de muestreo en primavera.

35 Resultados y Discusión

En los residuos de hojas del tratamiento control, 220,089 ascosporas se produjeron por g de residuo de hoja (peso seco). Esto fue equivalente a 37,171 ascosporas producidas por g de tejido de la hoja (peso fresco) presente en el otoño anterior (Tabla 9). En residuos de hojas que se trataron con *C. cladosporioides* H39 en el verano anterior, sólo se produjeron 109,044 ascosporas, equivalente a 15,733 ascosporas producidas por g de tejido de hoja (peso fresco) 40 presente en el otoño anterior. Esta reducción de la producción de ascosporas en 58%, respectivamente 50% en comparación con el tratamiento control fue estadísticamente significativa. El efecto de *C. cladosporioides* R406 en la producción de ascosporas en primavera después del tratamiento de las hojas del manzano durante el verano anterior fue menos pronunciado y sin significación estadística.

45 Se puede concluir que los tratamientos de los huertos durante el verano con el antagonista *C. cladosporioides* H39 y posiblemente también con *C. cladosporioides* R406 tienen un efecto duradero en la primavera siguiente sobre la producción de ascosporas por *V. inaequalis*. Un número reducido de ascosporas producidas en hojas de hibernación resultará en una presión de inóculo inferior durante la temporada de infección primaria de la sarna del manzano y así, un desarrollo más lento de la sarna en el comienzo de la epidemia. En nuestro conocimiento este es el primer informe que 50 demuestra que los tratamientos de hojas jóvenes del manzano en desarrollo, altamente susceptibles a la sarna, con un antagonista resulta en una producción de ascosporas significativamente inferior en las hojas tratadas en la temporada siguiente después de la hibernación.

55 Ejemplo 6 Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la producción de esporas de diversos patógenos

Objetivo

El objetivo de los siguientes experimentos fue evaluar el efecto del antagonista en varios otros patógenos de plantas.

60 Materiales y Métodos

Conidias de *Cladosporium cladosporioides* H39. Conidias de *Cladosporium cladosporioides* H39 se produjeron en un sistema de fermentación de estado sólido (SSF) por PROPHYTA Biologischer Pflanzenschutz GmbH, Alemania. Las conidias cosechadas se formularon como un gránulo dispersable en agua (WG). Para la conservación de la calidad del producto, el producto final se almacenó a -20 °C. La viabilidad de la conidia seca se determinó sobre agar extracto de 65

malta (1 g extracto de malta l⁻¹) antes del comienzo de los experimentos. Las conidias incubadas durante 24 horas a 20 °C con tubos germinales más largos que la mitad del diámetro mínimo de una conidia se consideró que era viable. Sesenta y cinco por ciento de las conidias fueron viables.

5 *Patógenos.* Los siguientes aislados de patógenos se usaron en el estudio (con medio de crecimiento usado para la producción de esporas entre paréntesis): *Nectriagalligena* 780 (agar de harina de avena; OA) que causa cancro en
frutales y podredumbre de la fruta *Stemphylium vesicarium* 850 (agar de harina de avena, OA) que causa la
10 enfermedad de la mancha marrón y podredumbre de la fruta en la pera *Botrytis aclada* 008 (OA) que causa podredumbre del cuello de la cebolla, *Botrytis cinerea* 143 (OA) que causa el moho gris en diversos cultivos, *Mycosphaerella fijiensis* 78 (agar patata dextrosa; PDA), que causa Sigatoka Negra en banana, *Fusarium graminearum* 820 (PDA) que causa fusariosis de la espiga en los cereales *Fusarium culmorum* 807 (PDA) que causa fusariosis de la espiga en los cereales, y *Alternaria brassicicola* 177 (PDA) que causa enfermedades en *Brassicaceae*. Todos los hongos se incubaron durante 14 días a 24°C con 12 hrs de oscuridad por día.

15 Para obtener suspensiones de esporas, los cultivos se inundaron con agua del grifo estéril que contiene 0.01% de Tween 80. Después de frotar suavemente con una espátula de goma para eliminar las esporas de los cultivos de hongos, las suspensiones se filtraron a través de gasa de nailon estéril con una malla de 200 µm. Las concentraciones de las suspensiones de esporas se determinaron con ayuda de un hemocitómetro y se ajustaron con agua del grifo estéril que contiene 0.01% (v/v) Tween 80 a 1x10² esporas ml⁻¹ y 1 x 10³ esporas ml⁻¹. Para los experimentos con
20 *Mycosphaerella fijiensis* fragmentos miceliales obtenidos también después de la trituración estéril de la masa micelial, se incluyeron en las suspensiones. Sólo fragmentos miceliales con más de tres células se consideraron cuando se ajustó la concentración de las suspensiones.

25 Diseño experimental. Experimentos por separado se llevaron a cabo para cada tipo de patógeno y sustrato y cada experimento se repitió. Hojas verdes asintomáticas de pera, cebolla, rosa, ciclamen *Pelargonium*, banana y repollo blanco se eliminaron de las plantas de invernaderos o cultivadas en el campo, y las hojas desprendidas se secaron durante varios días a temperatura ambiente. Las hojas secas se cortaron en segmentos de tamaño de aproximadamente 2 x 2 cm de largo, sellaron en bolsas de plástico y esterilizaron con radiación gamma de 40 kiloGray. Segmentos de cuatro cm de largo de la paja de trigo (con 1 nodo) y de ramas del manzano (con 1 rama) se procesaron
30 de la misma manera.

Segmentos de hojas, paja o ramas para su uso en los bioensayos se lavaron con agua del grifo estéril para eliminar nutrientes solubles. Por lo tanto, aproximadamente 80 segmentos de cada tipo de sustrato se colocaron en alícuotas de 150 ml de agua del grifo estéril contenidas en frascos cónicos de 250 ml estériles durante la noche a 4°C. Después de
35 eso, los segmentos se transfirieron en seco con papel de filtro estéril. Cuatro segmentos se colocaron en cada una de una serie de cámaras húmedas. Cada cámara consistió de un placa de Petri de plástico estéril (90 mm de diámetro) que contiene dos papeles de filtro estériles (85 mm de diámetro) y 6 ml de agua del grifo estéril. En cada experimento cinco repeticiones (placas de Petri) para los tratamientos con el antagonista *Cladosporium cladosporioides* H39 y cinco repeticiones para el control del agua se aplican en cada uno de los dos niveles de aplicación de patógenos (1x10²
40 esporas ml⁻¹ y 1 x 10³ esporas ml⁻¹). Durante el experimento, placas de Petri se dispusieron en un diseño completamente aleatorizado.

Las suspensiones de esporas (o fragmentos miceliales en un caso) de patógenos se atomizaron sobre los segmentos de hojas, paja o ramas en las cámaras húmedas. *Nectria galligena* se aplicó en los segmentos de rama del manzano, *Stemphylium vesicarium* en segmentos de hojas de pera, *Botrytis aclada* en segmentos de hojas de cebolla, *Botrytis cinerea* en segmentos de hojas de rosas, ciclamen y *Pelargonium*, *Mycosphaerella fijiensis* en segmentos de hojas de banana, *F. graminearum* y *F. culmorum* en segmentos de paja, y *Alternaria brassicicola* en segmentos de hojas del repollo blanco. Segmentos de tejido tratados se incubaron a 24 °C durante 18 hrs. Inmediatamente después del primer
45 periodo de incubación, las suspensiones de esporas de *Cladosporium cladosporioides* H39 (2 x 10⁶ esporas vitales ml⁻¹), o agua, se atomizaron en los segmentos. Los patógenos y antagonistas se aplicaron con atomizadores estériles en aproximadamente 5 µl cm⁻² de segmento de la hoja. Después de eso, las hojas se incubaron además a 24 °C en la oscuridad en las cámaras húmedas. Los segmentos de paja con *F. graminearum* y *F. culmorum* se incubaron desde el día 8 al día 13 con 12 horas de oscuridad al día. Ramas con *Nectria galligena* se incubaron a partir del día 12 al día 14 con 12 horas de oscuridad al día. Después un período de incubación total de 9 días para *Botrytis aclada* y *Alternaria brassicicolay* 12 días para *Botrytis cinerea* (contados a partir del día en que se aplicaron patógenos), el área superficial de los segmentos de la hoja cubierta con conidióforos de *Botrytis aclada*, *Botrytis cinerea* o *Alternaria brassicicola* se estimó usando clases de cero a cinco años, que representaron, respectivamente, 0%, 1 - 5%, >5 - 25%, >25 - 50%, >50 - 75%, y >75 - 100% de la superficie foliar cubierta con las estructuras productoras de esporas de los patógenos (Köhl y otros 1995, European Journal of Plant Pathology 101, 627-637). En el caso de *Stemphylium vesicarium*, no se produjeron conidióforos, pero la etapa perfecta (*Pleospora allii*) produjo pseudotecios abundantes. La cobertura de la
50 superficie foliar con pseudotecios se estimó 16 días después de la inoculación con las mismas cláusulas que para la cobertura con conidióforos. Por el número de segmentos de hojas de cada clase (n₀₋₅) un índice de esporulación (SI) en el intervalo de cero a cien se calculó para cada replicación (placa de Petri) consistente de cuatro segmentos de la hoja (SI = (0 x n₀ + 5 x n₁ + 25 x n₂ + 50 x n₃ + 75 x n₄ + 100 x n₅)/4). El número de colonias producidas por *Mycosphaerella fijiensis* en los segmentos de hojas de banana se contó después de un período de incubación de 15 días. El número de
65

- conidia de *F. graminearum* y *F. culmorum* producido en los segmentos de paja después de 13 días se contó usando un microscopio. Por lo tanto, los segmentos de paja de cada placa de Petri se colocaron en un frasco Erlenmeyer (100 ml) que contiene 10 ml de un líquido de lavado (etanol al 20% en agua de grifo que contiene 0.01% de Tween 80). Los frascos se agitaron en un agitador recíproco durante 10 min, y la concentración de conidias en las suspensiones se determinó microscópicamente para *F. graminearum* y *F. culmorum* usando un hemocitómetro. El mismo método se usó para cuantificar el número de conidia de *Nectria galligena* en segmentos de rama del manzano después de un período de incubación de 14 días.
- Estadísticas. Los datos se analizaron por separado para cada experimento por ANOVA seguido por pruebas LSD. Si las interacciones de tratamiento con antagonistas x concentración de patógenos no fueron significativas, el efecto medio del tratamiento con el antagonista se analiza como efecto principal. Los datos de los recuentos de esporas se transformaron a logaritmo antes de su análisis: $\log\text{-número de esporas} = \log_{10}(\text{número de esporas} + 0.01)$.
- Resultados y Discusión
- Nectria galligena*. Un fuerte efecto antagonista de *Cladosporium cladosporioides* H39 se encontró frente a *Nectria galligena* causando cancro en árboles frutales y podredumbre de la fruta. En los huertos, el patógeno sobrevive y se multiplica en las áreas de las ramas con la herida infectada (cancros) (McCracken y otros, 2003, Plant Pathology 52, 553-566). El inóculo producido en los bioensayos en tales tejidos bajo condiciones controladas se redujo por el antagonista en más de un 99% (Tabla 10).
- Los resultados muestran que *Cladosporium cladosporioides* H39 tiene un alto potencial para su uso en el control biológico del cancro de árbol frutal que es además de la sarna, la enfermedad más importante en la producción de manzana y pera. Las aplicaciones del antagonista poseen así el potencial para controlar las dos principales enfermedades, la sarna, así como cancro de árbol frutal, en los principales cultivos de frutas de pomó.
- Stemphylium vesicarium*. *Stemphylium vesicarium* está causando la mancha marrón de la pera en las principales áreas de producción de pera en Europa (Llorente & Montesinos, 2006). La principal fuente de inóculo primario de la enfermedad son las hojas necróticas por hibernación de la pera en la que se producen los pseudotecios de la etapa perfecta (*Pleospora alli*).
- Las aplicaciones de la *Cladosporium Cladosporium* H39 sobre las hojas necróticas, pre-colonizadas por el patógeno, redujeron significativamente la formación de pseudotecios (estimado por la evaluación de la cobertura superficial de la hoja en órganos que producen las esporas) en ambos experimentos (Tabla 11). El control biológico de la mancha marrón por *Cladosporium cladosporioides* H39 se puede lograr así mediante aplicaciones del antagonista a la cubierta o suelo del huerto después de la caída de hojas.
- Stemphylium vesicarium* se aplicó a una concentración de 1×10^2 esporas ml^{-1} y 1×10^3 esporas ml^{-1} 18 hrs antes H39 se aplicó con 2×10^6 esporas ml^{-1} .
- ¹Se estimó la media de 5 repeticiones, cada una con 4 segmentos de hoja; cobertura de la superficie foliar con pseudotecios.
- ²Significativamente diferente del tratamiento control (prueba LSD; $\alpha = 0.05$).
- Botrytis* spp. Presencia de tejidos necróticos del huésped es un pre-requisito para epidemias de moho gris y otras enfermedades causadas por *Botrytis* spp. Se demostró que la exclusión competitiva de *Botrytis* spp. de los tejidos necróticos del huésped se pueden explotar para el control biológico de las enfermedades inducidas por *Botrytis* (Köhl y otros., 2003, BioControl 48, 349-359).
- Cladosporium cladosporioides* H39 redujo significativamente la esporulación de *Botrytis aclada* y *Botrytis cinerea* en bioensayos en los tejidos de los cuatro huéspedes diferentes analizados (Tablas 12 - 15). El antagonista tiene así un potencial para el control biológico de las enfermedades inducidas por *Botrytis* - en diversos cultivos.
- Mycosphaerella fijiensis*. *Mycosphaerella fijiensis* está causando Sigatoka negra en banana (Arzanlou y otros, 2007, Phytopathology 97, 1112-1118). La enfermedad es la mayor amenaza en la producción de banana. El control de enfermedades en la actualidad depende de múltiples aplicaciones de fungicidas. El patógeno sobrevive y se multiplica en las lesiones necróticas en las hojas.
- Los resultados del bio-ensayo en las hojas necróticas de banana muestran que el antagonista *Cladosporium cladosporioides* H39 tiene un potencial prometedor para el control biológico de la enfermedad. Aunque las esporas no se formaron por el patógeno bajo las condiciones experimentales, es evidente que se pudo demostrar que el antagonista es capaz de excluir el patógeno de la colonización del sustrato (Tabla 16).
- Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum*. *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum* son causantes de la Fusariosis de la espiga en los cereales y maíz. La enfermedad está causando pérdidas de rendimiento y,

frecuentemente más importantes, graves pérdidas de calidad debido a la formación de micotoxinas por los patógenos. Los rastrojos de paja y otros desechos son la principal fuente de inóculo de la enfermedad (Osborne & Stein, 2007, International Journal of Food Microbiology 119, 103-108).

5 *Cladosporium cladosporioides* H39 redujo significativamente la producción de conidias de ambos *Fusarium* spp. en los segmentos de paja pre-colonizados por los patógenos (Tabla 17 y 18) y así tiene el potencial para el uso en el biocontrol de estos importantes patógenos en la producción de cereal.

10 *Alternaria brassicicola*. La mancha Negra foliar causada por *Alternaria brassicicola* es la principal enfermedad de Brassiceae en la producción vegetal. El patógeno esporula dentro de las lesiones necróticas infectadas y desechos de cultivos (Humpherson-Jones, 1989, Annals of Applied Biology 115, 45-50). Aparte de las hojas, se pueden dañar las plántulas enteras además, así como vainas que incluyen semillas en desarrollo en los campos de producción de semilla.

15 Se encontró una fuerte reducción significativa de la producción de conidias de *Alternaria brassicicola* en los bioensayos después de la aplicación de *Cladosporium cladosporioides* H39 para las hojas necróticas pre-colonizadas de repollo blanco (Tabla 19).

Ejemplo 7 Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la podredumbre del fruto del manzano

20 **Objetivo**

El objetivo de un experimento posterior fue evaluar el efecto del antagonista en *Monilia fructigena* que causa podredumbre del fruto posterior a la cosecha en el manzano.

25 **Materiales y Métodos**

Conidia de Cladosporium cladosporioides H39. Las conidias de *Cladosporium cladosporioides* H39 se produjeron como en el Ejemplo 6.

30 **Patógenos.** *Monilia fructigena* 1067, que causa podredumbre del fruto en varios cultivos de frutos, se cultivó en agar de harina de avena durante 14 días a 24 °C con 12 horas de luz negra por día. Para obtener las suspensiones de esporas, los cultivos se inundaron con agua del grifo estéril que contiene 0.01% de Tween 80. Después de frotar suavemente con una espátula de goma para eliminar las esporas de los cultivos de hongos, las suspensiones se filtraron a través de gasa de nylon estéril con una malla de 200 µm. Ya que la esporulación fue pobre, los fragmentos miceliales, además, obtenidos después del triturado estéril de la masa micelial, se incluyeron en las suspensiones. Se consideraron sólo los fragmentos miceliales con más de tres células cuando la concentración de las suspensiones se determinó con la ayuda de un hemocitómetro y se ajustó con agua del grifo estéril que contiene 0.01% (v/v) de Tween 80 a 1×10^2 esporas y fragmentos miceliales ml^{-1} y 1×10^3 esporas y fragmentos miceliales ml^{-1} .

40 **Diseño Experimental.** Manzanas cv Elstar producidas orgánicamente asintomáticas se usaron en los bioensayos. Las superficies de las manzanas se esterilizaron sumergiendo en etanol al 70% durante 1 min y se lavaron tres veces en agua del grifo estéril. Cuatro manzanas se colocaron en cámaras húmedas (tamaño 28 x 15 x 9 cm; con papel de filtro humedecido en el fondo; cerrado por una tapa) y dos heridas (aproximadamente 3 mm de diámetro y 5 mm de profundidad) se hicieron usando recolectores cóctel estériles (Jijakli & Lepoivre, 1992, In: Fokkema, N.J., J. Köhl & Y. Elad, Biological control of foliar and post-harvest diseases, IOBC/WPRS Bulletin Vol. 16(11), págs. 106-110.). Cincuenta µl de agua estéril se aplicaron a las heridas de los tratamientos control. En otro tratamiento, 50 µl de una suspensión conidial de *Cladosporium cladosporioides* H39 (2×10^6 esporas vitales ml^{-1}) se añadieron a cada herida. Las manzanas tratadas se incubaron a 24 °C durante 24 horas. Posteriormente, las manzanas se trataron con suspensiones de esporas y fragmentos miceliales de *Monilia fructigena* a 1×10^2 y 1×10^3 esporas y fragmentos miceliales y se incubaron además en las cámaras húmedas a 24 °C. Cada tratamiento se llevó a cabo en 5 réplicas, cada réplica que consiste en 4 manzanas en la misma cámara húmeda y las cámaras húmedas con varios tratamientos se arreglaron en un diseño completamente aleatorizado. El experimento se repitió dos veces. El diámetro de las lesiones desarrolladas por las heridas inoculadas se midió 8 y 12 días después de la aplicación de *Monilia fructigena*.

55 **Resultados y Discusión**

La *Monilia fructigena* causó severa podredumbre de la fruta en las heridas de las manzanas bajo las condiciones experimentales, por ejemplo, las lesiones se produjeron en el tratamiento control de ambos experimentos sobre todas las heridas en el nivel alto de patógeno. La aplicación de conidias de *Cladosporium cladosporioides* H39 redujo el número de heridas infectadas en la mayoría de los casos (Tabla 20a). El tamaño promedio de la lesión se redujo mediante tratamientos con los antagonistas hasta 70% (Tabla 20b). En promedio, la podredumbre de la fruta (medido como tamaño de la lesión) se redujo estadísticamente de manera significativa por 50% en el primer experimento, y en un 30% en el segundo experimento.

65 Los resultados demuestran que las aplicaciones de *Cladosporium cladosporioides* H39 durante la temporada de

crecimiento tienen el potencial de proteger los frutos del manzano de la podredumbre de la fruta antes de la cosecha y posterior a la cosecha causada por *Monilia fructigena*. Además los tratamientos posterior a la cosecha con *Cladosporium cladosporioides* H39 son prometedores para proteger la fruta de la podredumbre posterior a la cosecha durante el almacenamiento.

Tabla 1. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la producción de conidias de *Venturia inaequalis* en plántulas de manzano en condiciones controladas. En total, 63 aislados de hongos se probaron en 14 experimentos. Se presentan sólo los resultados del aislado promotor.

Tratamiento	Número de conidia cm ⁻² ^a						
	Experimento						
	1 (n=8) ^b	3 (n=9)	9 (n=10)	10 (n=10)	11 (n=10)	13 (n=10)	14 (n=11)
Número de tratamientos de las hojas más jóvenes	8	9	10	10	10	10	11
Control	1339	4915	1960	2393	4188	728	1480
<i>C. cladosporioides</i> H39	-	-	-	-	863* (79)	330 (55)	572 (61)
Hojas viejas							
Control	-	-	331	359	1313	144	614
<i>C. cladosporioides</i> H39	-	-	-	-	354* (73)	116 (19)	162* (74)
^a Valores retrotransformados; eficacia relativa para controlar el tratamiento entre paréntesis.							
^b Número total de tratamientos							
^c Estadísticamente diferente del tratamiento control.							
^d No probado.							

En los experimentos 1 y 3, las 4 hojas más jóvenes por plántula se mezclaron; en los otros experimentos, la hoja más joven se muestreó por separado a partir de las 3 hojas próximas a la mayor.

Tabla 2A Efecto de las aplicaciones de *Phoma pinodella* H3, *Coniothyrium cereale* H33, *Cladosporium* sp. H35 y *Cladosporium cladosporioides* H39 en la producción de conidias de *Venturia inaequalis* ajo las condiciones de huerto. Experimentos 1, 5, y 6.

Tratamiento	Ln-Número de conidia cm ⁻²							
	Experimento							
	1		5		6		Media	
Hojas más jóvenes								
Control	9.5	(12.8)	10.1	(24.9)	9.8	(18.0)	9.8	(18.0)
<i>C. cladosporioides</i> H39	9.1	(8.6)	10.7	(46.1)	10.7	(42.5)	10.2	(26.9)
<i>C. cladosporioides</i> H39 formulada, baja viabilidad	-		10.4	(32.4)	10.4	(31.8)	10.4	(32.9)
Hojas viejas								
Control	9.2	(9.5)	9.2	(9.6)	9.3	(10.4)	9.2	(9.9)
<i>C. cladosporioides</i> H39	9.5	(12.9)	10.2	(26.1)	9.7	(16.1)	9.8	(18.0)
<i>C. cladosporioides</i> H39 formulada, baja viabilidad	-		9.3	(11.0)	9.7	(16.1)	9.5	(13.3)
^a Valores retrotransformados x 1000 entre paréntesis								

Tabla 2. B Efecto de las aplicaciones de *Phoma pinodella* H3, *Coniothyrium cereale* H33, *Cladosporium* sp. H35 y *Cladosporium cladosporioides* H39 en la producción de conidias de *Venturia inaequalis* bajo las condiciones de huerto. Experimentos 2, 3, 4, 7, y 8.

5		Ln- Número de conidia cm ⁻² ^a											
	Tratamiento	Experimento											
		2		3		4		7		8		Media	
	Hojas más jóvenes												
10	Control	8.2	(3.6)	7.6	(2.1)	10.7	(46.3)	11.8	(132.1)	12.3	(227.3)	10.1	(25.3)
	<i>C.cladosporioides</i> H39	8.9	(6.9)	7.9	(2.7)	10.2	(25.8)	12.4	(253.8)	12.1	(183.8)	10.3	(29.5)
	<i>C.cladosporioides</i> H39	7.4	(1.6)	6.9	(0.9)	10.4	(31.7)	11.4	(90.4)	11.9	(147.2)	9.6*	(14.6)
15	formulado												
	Hojas viejas												
	Control	10.6	(40.3)	9.2	(12.3)	9.2	(9.8)	11.2	(72.8)	11.8	(132.1)	10.4	(33.0)
20	<i>C. cladosporioides</i> H39	10.5	(35.3)	8.9	(7.5)	8.7	(5.8)	11.4	(93.4)	11.9	(145.7)	10.3	(27.6)
	<i>C. cladosporioides</i> H39	10.0	(21.3)	8.6	(5.5)	8.8	(6.6)	10.9	(52.3)	11.4	(90.7)	9.9*	(20.5)
	formulado												
25	^a Valores retrotransformados x 1000 entre paréntesis												
	^b Estadísticamente diferente del tratamiento control												

Tabla 3. Fechas de aplicación y germinación de las esporas de inóculos aplicados de H39 y R406 (según se estima a partir del conteo de 1 de la placa de agar atomizada en el huerto).

30	Fecha de aplicación		Germinación de la espora (%)	
			H39	R406
35	28 junio		76	-
	2 julio		26	-
	5 julio		47	-
40	9 julio		-	-
	12 julio		28	96
	16 julio		32	97
45	19 julio		28	95
	23 julio		19	97
	26 julio		26	94
50	30 julio		23	96
	2 agosto		16	97
	6 agosto		11	90
55	9 agosto		4	96
	13 agosto		4	95
	16 agosto		10	95
60	20 agosto		4	73

Tabla 4 Colonización epifítica de las hojas del manzano muestreadas el 4 de octubre de 2007. Las hojas se habían tratado dos veces por semana del 28 de junio hasta el 20 de agosto con H39 y V301.61 (16 aplicaciones en total) o del 12 de julio hasta el 20 de agosto con R406 (12 solicitudes en total).

Tratamiento	Número de UFC cm ⁻² de la superficie foliar (retrotransformado)		
	<i>Cladosporium</i> spp.	Hongos diferentes con hifas a partir de <i>Cladosporium</i> spp.	Levaduras
Control	1005	1285	397 a ¹
H39	2223	1042	152 b
R406	502	400	100 b
	(F _{prob} =0.076)	(F _{prob} =0.069)	
¹ Los valores de la misma columna con letras comunes no difieren estadísticamente de manera significativa (LSD; α = 0.05)			

Tabla 5. Colonización endofítica de hojas del manzano muestreadas el 4 de octubre de 2007. Las hojas se habían tratado dos veces por semana del 28 de junio hasta el 20 de agosto con H39 y V301.61 (16 aplicaciones en total) o del 12 de julio hasta el 20 de agosto con R406 (12 solicitudes en total).

Tratamiento	Número de UFC cm ⁻² de la superficie foliar (retrotransformado)		
	<i>Cladosporium</i> spp.	Hongos diferentes con hifas a partir de <i>Cladosporium</i> spp.	Levaduras
Control	1.19 b ¹	4.97	1.95
H39	1.66 a	2.72	3.75
R406	1.20 b	2.93	1.99
		(F _{prob} =0.182)	(F _{prob} =0.171)
¹ Los valores de la misma columna con letras comunes no difieren estadísticamente de manera significativa (LSD; α = 0.05)			

Tabla 6. Efecto de las aplicaciones de atomización del antagonista R406 en las hojas del manzano en el otoño de 2005 en el contenido de ADN de *V. inaequalis* en la primavera según lo determinado por PCR en tiempo real de especies específicas (TaqMan-PCR). Los residuos de la hoja se muestrearon el 23 a 31 enero de 2006.

Tratamiento	pg DNA de <i>V. inaequalis</i>	
	por mg peso seco de residuos de la hoja	en los residuos de 80 hojas
Control	372	10093
R406	226	5007* ¹
¹ Estadísticamente de forma significativa diferente del tratamiento control (LSD _{5%} = 5057).		

Tabla 7. Efecto de las aplicaciones de la atomización del antagonista R406 en las hojas del manzano en el otoño de 2005 en la producción de ascopora de *V. inaequalis* en los residuos de hoja de 80 hojas en la primavera de 2006.

Tratamiento	Número de ascoporas por 80 hojas		
	Log ₁₀ -transformado	Retrotransformado	Con relación al control ¹
Control	5.88	749894	100
R406	5.37 * ²	235505	31
¹ En la escala retro-transformada.			
² Estadísticamente de forma significativa diferente del tratamiento control (LSD _{5%} = 0.3604).			

Tabla 8 Efecto de las aplicaciones del atomizador del antagonista R406 en las hojas del manzano en el otoño de 2005 en la producción de ascopora de *V. inaequalis* por gramo de residuos de hoja en la primavera de 2006.

Tratamiento	Número de ascoporas por g de residuo hoja		
	Log ₁₀ -transformados	Retro-transformado	Con relación al control ¹
Control	4.54	34316	100
R406	4.07 * ²	11722	34
¹ En la escala retro-transformado			
² Estadísticamente de forma significativa diferente del tratamiento control (LSD _{5%} = 0.3183).			

Tabla 9. Efecto de los tratamientos de las hojas jóvenes con *Cladosporium cladosporioides* H39 y R406 se llevaron a cabo durante el verano entre el 28 de junio y 20 de agosto en la producción de ascoporas de *Venturia inaequalis* en hojas tratadas después de la hibernación en el suelo del huerto. Experimento del huerto 2007/2008.

Tratamiento	Log-Número de ascoporas g ⁻¹ de			
	muestra original de la hoja (peso fresco)		residuos de hojas en la primavera (peso seco)	
Control	4.57	(37,171) ^a	5.34	(220,089)
H39	4.20 * ^b	(15,733)	5.04 *	(109,044)
R406	4.52	(32,991)	5.32	(211,203)
^a Valores retrotransformados.				
^b Significativamente diferente del tratamiento control (prueba LSD de un lado; a = 0,05)				

Tabla 10. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la esporulación de *Nectria galligena* en segmentos de rama del manzano incubadas en cámara húmeda a 24 °C durante 14 días.

Log-Número de conidia por segmento de paja ¹					
Tratamiento	1x10 ² esporas ml ⁻¹		1x10 ³ esporas ml ⁻¹		Media
Experimento 1					
Control agua	6.64	(4,365,200)	6.56	(3,630,80 6.60 0)	(3,981,100)
H39	3.76	(5,800)	3.06	(1,100) 3.41 * ²	(2,600)
Experimento 2					
Control agua	6.59	(3,881,500)	6.75	(562,300) 6.67	(4,666,600)
H39	4.32	(20,900)	4.44	(27,200) 4.38 *	(23,800)
<i>Nectria galligena</i> se aplicó a una concentración de 1 · 10 ² esporas ml ⁻¹ y 1 · 10 ³ esporas ml ⁻¹ 18 horas antes H39 se aplicó con 2x10 ⁶ esporas · ml ⁻¹ .					
¹ Media de 5 repeticiones, cada una con 4 segmentos de rama; valores retrotransformados entre paréntesis.					
² Significativamente diferente del tratamiento control (prueba LSD; a = 0.05).					

Tabla 11. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la esporulación de *Pleospora allii* (*Stemphylium vesicarium*) en las hojas necróticas de pera incubadas en cámara húmeda a 24 °C durante 16 días.

Índice de esporulación de <i>Pleospora allii</i> ¹			
Tratamiento	1x10 ² esporas ml ⁻¹	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Media
Experimento 1			
Control agua	29.5	36.8	33.1
H39	8.2	26.8	17.5 * ²
Experimento 2			
Control agua	49.0	48.8	48.9
H39	11.5	18.2	14.9 * ²

Tabla 12. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la esporulación de *Botrytis aclada* en hojas necróticas de cebolla incubadas en cámara húmeda a 24 °C durante 9 días.

Índice de esporulación de <i>Botrytis aclada</i> ¹			
Tratamiento	1x10 ² esporas ml ⁻¹	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Media
Experimento 1			
Control agua	93.8	98.8	96.2
H39	10.0	12.0	11.0 * ²
Experimento 2			
Control agua	92.5	83.0	87.8
H39	8.8	18.0	13.4 *
<i>Botrytis aclada</i> se aplicó a una concentración de 1x10 ² esporas ml ⁻¹ y 1x10 ³ esporas ml ⁻¹ 18 horas antes H39 se aplicó con 2x10 ⁶ esporas ml ⁻¹ . ¹ Media de 5 repeticiones, cada uno con 4 segmentos de la hoja. ² Significativamente diferente del tratamiento control (prueba LSD; α = 0.05).			

Tabla 13. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la esporulación de *Botrytis cinerea* en hojas necróticas de rosa incubadas en cámara húmeda a 24 °C durante 12 días.

Índice de esporulación de <i>Botrytis cinerea</i> ¹			
Tratamiento	1x10 ² esporas ml ⁻¹	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Media
Experimento 1			
Control agua	76.2	85.0	80.6
H39	17.5	43.0	30.2 * ²
Experimento 2			
Control agua	61.5	96.2	78.9
H39	35.8	85.0	60.4 *

Botrytis cinerea se aplicó a una concentración de 1x10² esporas ml⁻¹ y 1x10³ esporas ml⁻¹ 18 horas antes H39 se aplicó con 2x10⁶ esporas ml⁻¹.

¹ Media de 5 repeticiones, cada uno con 4 segmentos de la hoja.

² Significativamente diferente del tratamiento control (prueba LSD; α = 0.05).

Tabla 14. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la esporulación de *Botrytis cinerea* en hojas necróticas de ciclamen incubadas en cámara húmeda a 24 °C durante 12 días.

Tratamiento	Índice de esporulación de <i>Botrytis cinerea</i> ¹	
	1x10 ² esporas ml ⁻¹	1x10 ³ esporas ml ⁻¹
Experimento 1		
Control agua	95.0	95.0
H39	28.2 * ²	66.5 *
Experimento 2		
Control agua	95.0	90.0
H39	57.8 *	95.5

Botrytis cinerea se aplicó a una concentración de 1x10² esporas ml⁻¹ y 1x10³ esporas ml⁻¹ 18 horas antes H39 se aplicó con 2x10⁶ esporas ml⁻¹.

¹ Media de 5 repeticiones, cada uno con 4 segmentos de la hoja.

² Significativamente diferente del tratamiento control (prueba LSD; a = 0.05).

Tabla 15. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la esporulación de *Botrytis cinerea* en hojas necróticas de *Pelargonium* incubadas en cámara húmeda a 24 °C durante 12 días.

Tratamiento	Índice de esporulación de <i>Botrytis cinerea</i> ¹		
	1x10 ² esporas ml ⁻¹	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Media
Experimento 1			
Control agua	34.8	42.0	38.4
H39	1.5	8.5	5.0 * ²
Experimento 2			
Control agua	24.5	23.2	23.9
H39	0.2	11.0	5.6 *

Botrytis cinerea se aplicó a una concentración de 1x10² esporas ml⁻¹ y 1x10³ esporas ml⁻¹ 18 horas antes H39 se aplicó con 2x10⁶ esporas ml⁻¹.

¹ Media de 5 repeticiones, cada uno con 4 segmentos de la hoja.

² Significativamente diferente del tratamiento control (prueba LSD; a = 0.05).

Tabla 16. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la esporulación de *Mycosphaerella fijiensis* en hojas necróticas de banana incubadas en cámara húmeda a 24 °C durante 15 días.

Tratamiento	Número de colonias de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> por segmento de la hoja ¹
Experimento 1	
Control agua	5.65
H39	0.15 * ²
Experimento 2	
Control agua	10.15
H39	0.00 *

Mycosphaerella fijiensis se aplicó a una concentración de 1x10³ fragmentos miceliales ml⁻¹ 18 horas antes H39 se aplicó con 2x10⁶ esporas ml⁻¹.

¹ Media de 5 repeticiones, cada uno con 4 segmentos de la hoja.

² Significativamente diferente del tratamiento control (prueba LSD; a = 0.05).

Tabla 17. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la esporulación de *Fusarium graminearum* en paja de trigo incubadas en cámara húmeda a 24 °C durante 13 días.

	Log-Número de conidia por segmento de paja ¹			
Tratamiento	1x10 ² esporas ml ⁻¹		1x10 ³ esporas ml ⁻¹	
Experimento 1				
Control agua	5.615	(412,100)	5.731	(538,300)
H39	4.759 * ²	(57,400)	5.501	(317,000)
Experimento 2				
Control agua	5.872	(744,700)	5.885	(767,400)
H39	5.416 *	(260,600)	5.670 *	(467,700)

Fusarium graminearum se aplicó a una concentración de 1x10² esporas ml⁻¹ y 1x10³ esporas, ml⁻¹ 18 horas antes H39 se aplicó con 2x10⁶ esporas ml⁻¹.

¹ Media de 5 repeticiones, cada uno con 4 segmentos de paja; valores retrotransformados entre paréntesis

² Significativamente diferente del tratamiento control (prueba LSD; a = 0.05).

Tabla 18. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la esporulación de *Tusarium culmorum* en paja de trigo incubadas en cámara húmeda a 24 °C durante 13 días.

	Log-Número de conidia por segmento de paja ¹					
Tratamiento	1x10 ² esporas ml ⁻¹		1x10 ³ esporas ml ⁻¹		Media	
Experimento 1						
Control agua	6.496	(3,133,290)	6.614	(4,111,50 0)	6.555	(3,589,200)
H39	6.092	(1,235,900)	6.390	(2,454,70 0)	6.241 * ²	(1,741,800)
Experimento 2						
Control agua	6.446	(2,792,500)	6.521	(3,318,90 0)	6.484	(3,047,900)
H39	6.222	(1,667,200)	6.413	(2,588,20 0)	6.317 *	(2,074,900)

Fusarium culmorum se aplicó a una concentración de 1x10² esporas ml⁻¹ y 1x10³ esporas ml⁻¹ 18 horas antes H39 se aplicó con 2x10⁶ esporas ml⁻¹.

¹ Media de 5 repeticiones, cada uno con 4 segmentos de paja; valores retrortransformados entre paréntesis

² Significativamente diferente del tratamiento control (prueba LSD; a = 0.05).

Tabla 19. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la esporulación de *Alternaria brassicicola* en hojas necróticas de repollo blanco incubadas en cámara húmeda a 24 °C durante 9 días.

Índice de esporulación de <i>Alternaria brassicicola</i> ¹			
Tratamiento	1x10 ² esporas ml ⁻¹	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Media
Experimento 1			
Control agua	72.5	80.0	76.2
H39	2.5	23.2	12.9 * ²
Experimento 2			
Control agua	78.8	87.5	
H39	11.5 *	41.8 *	

Alternaria brassicicola se aplicó a una concentración de 1x10² esporas ml⁻¹ y 1x10³ esporas ml⁻¹ 18 horas antes H39 se aplicó con 2x10⁶ esporas ml⁻¹.

¹ Media de 5 repeticiones, cada uno con 4 segmentos de la hoja.

² Significativamente diferente del tratamiento control (prueba LSD_α; = 0.05).

Tabla 20. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la podredumbre de la fruta causada por *Monilia fructigena* en manzanas cv Elstar incubadas en cámara húmeda a 24 °C durante 8 y 12 días.

a. Número de lesiones producidas por 8 heridas.			
Número de lesiones ¹			
Tratamiento	1x10 ² esporas ml ⁻¹	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Media
Día 8			
Control agua	4.8	8.0	6.4
H39	1.8	6.6	4.2 * ²
Día 12			
Control agua	8.0	6.4	7.2
H39	7.4	5.4	6.4

b. Diámetro de la lesión promedio.			
Diámetro de la lesión (mm) ¹			
Tratamiento	1x10 ² esporas ml ⁻¹	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Media
Día 8			
Control agua	19.0	43.1	31.1
H39	5.6	24.7	15.2 * ²
Día 12			
Control agua	53.3	85.7	69.5
H39	31.1	66.2	48.6 *

Cladosporium cladosporioides H39 se aplicó a las heridas usando 50 µl de suspensión de esporas 2x10⁶ esporas ml⁻¹. Después de 24 hrs, *Monilia fructigena* se aplicaron usando 50 µl de suspensión a 1x10² esporas y fragmentos miceliales ml⁻¹ y 1x10³ esporas y fragmentos miceliales ml⁻¹.

¹ Media de 5 repeticiones, cada una con 4 manzanas con 2 heridas tratadas por manzana.

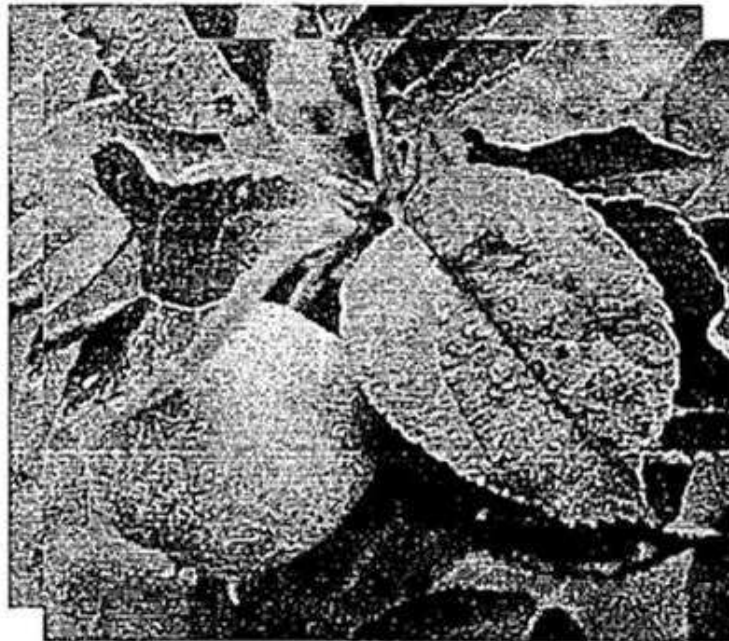
² Significativamente diferente del tratamiento control (prueba LSD; α = 0.05).

Reivindicaciones

1. *Cladosporium cladosporioides* H39, depositada el 13 de diciembre de 2007 con el número CBS 122244 en el Centraal Bureau Schimmelcultures, Baarn, Países Bajos.
2. *Cladosporium cladosporioides* R406, depositada el 13 de diciembre de 2007 con el número CBS 122243 en el Centraal Bureau Schimmelcultures, Baarn, Países Bajos.
3. Composición para controlar un patógeno de planta de las hojas, frutos y espigas, que comprende un *Cladosporium* de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
4. Composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho patógeno de planta se selecciona del grupo que consiste en sarna del manzano (*Venturia inaequalis*), sarna de la pera (*Venturia pirina*), mancha foliar (*Blumeriella jaapi*), mancha negra de las rosas (*Diplocarpon rosae* / *Marssonina rosae*), mancha marrón (*Stemphylium vesicarium*), oidio (*Podosphaera leucotricha* / *Sphaerotheca pannosa*), oidio de la begonia (*Microsphaera begoniae*), oidio de la fresa (*Sphaerotheca macularis*), mancha de hollín (*Gloeodes pomigena*), mancha de mosca (*Zygophiala jamaicensis*), lepra del duraznero (*Taphrina deformans*), podredumbre parda/cancro del brote (*Monilia fructigena*, *M. laxa*), moho de la pera (*Gymnosporangium sabinae* / *G. fuscum*), cancro (*Nectria galligena*), mancha negra de las rosas (*Diplocarpon rosae*), moho de las rosas (*Phragmidium tuberculatum* / *Phragmidium spp.*), *Botrytis spp.* en varias plantas, *Mycosphaerella brassicicola* en repollo, *Mycosphaerella fijiensis* en banana, *Alternaria spp.* en *Brassica*, patata y varias otras plantas, *Fusarium spp.* especialmente en cereales que incluyen maíz, *Phytophthora infestans* de patata y *Plasmopara viticola* en la vid, preferentemente en donde dicho patógeno foliar fúngico es sarna del manzano.
5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en donde el *Cladosporium* está presente como esporas.
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además un portador para las esporas de *Cladosporium*, preferentemente en donde dicho portador es glucosa.
7. Composición para controlar un patógeno de planta de las hojas, frutos y espigas, que comprende conidia de un *Cladosporium* de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
8. Un método para controlar un patógeno en las plantas, que comprende tratar dichas plantas con una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-7.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha composición se atomiza sobre las hojas, frutos o espigas de la planta.
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en donde el control del patógeno comprende la prevención de la infección y/o una disminución del daño de la planta causado por dicho patógeno.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde dicho patógeno se selecciona del grupo que consiste en sarna del manzano (*Venturia inaequalis*), sarna de la pera (*Venturia pirina*), mancha foliar (*Blumeriella jaapi*), mancha negra de las rosas (*Diplocarpon rosae* / *Marssonina rosae*), mancha marrón (*Stemphylium vesicarium*), oidio (*Podosphaera leucotricha* / *Sphaerotheca pannosa*), oidio de la begonia (*Microsphaera begoniae*), oidio de la fresa (*Sphaerotheca macularis*), mancha de hollín (*Gloeodes pomigena*), mancha de mosca (*Zygophiala jamaicensis*), lepra del duraznero (*Taphrina deformans*), podredumbre parda/cancro del brote (*Monilia fructigena*, *M. laxa*), moho de la pera (*Gymnosporangium sabinae* / *G. fuscum*), cancro (*Nectria galligena*), mancha negra de las rosas (*Diplocarpon rosae*), moho de las rosas (*Phragmidium tuberculatum* / *Phragmidium spp.*), *Botrytis spp.* en varias plantas, *Mycosphaerella brassicicola* en repollo, *Mycosphaerella fijiensis* en banana, *Alternaria spp.* en *Brassica*, patata y varias otras plantas, *Fusarium spp.* especialmente en cereales que incluyen maíz, *Phytophthora infestans* de patata y *Plasmopara viticola* en la vid, preferentemente en donde dicho patógeno foliar fúngico es la sarna del manzano.
12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde dicha composición se aplica antes de la cosecha.
13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde dicha composición se aplica posterior a la cosecha.

- 5
14. Uso de un *Cladosporium* de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-7 para la prevención o tratamiento de la infección de hojas, frutos o espigas de una planta por un patógeno.
 15. Una cepa de *Cladosporium* de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-7 para usar en el control de una infección por patógenos de la planta.

Figura 1A



B



Figura 2

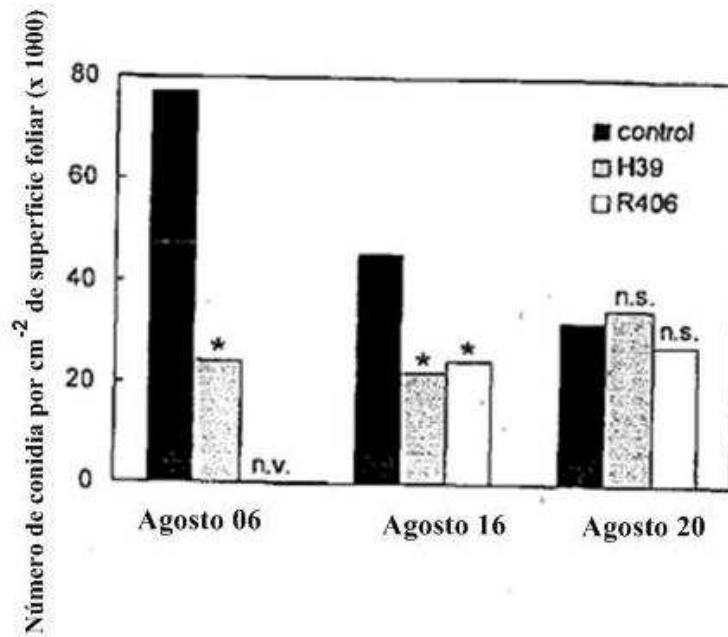


Figura 3

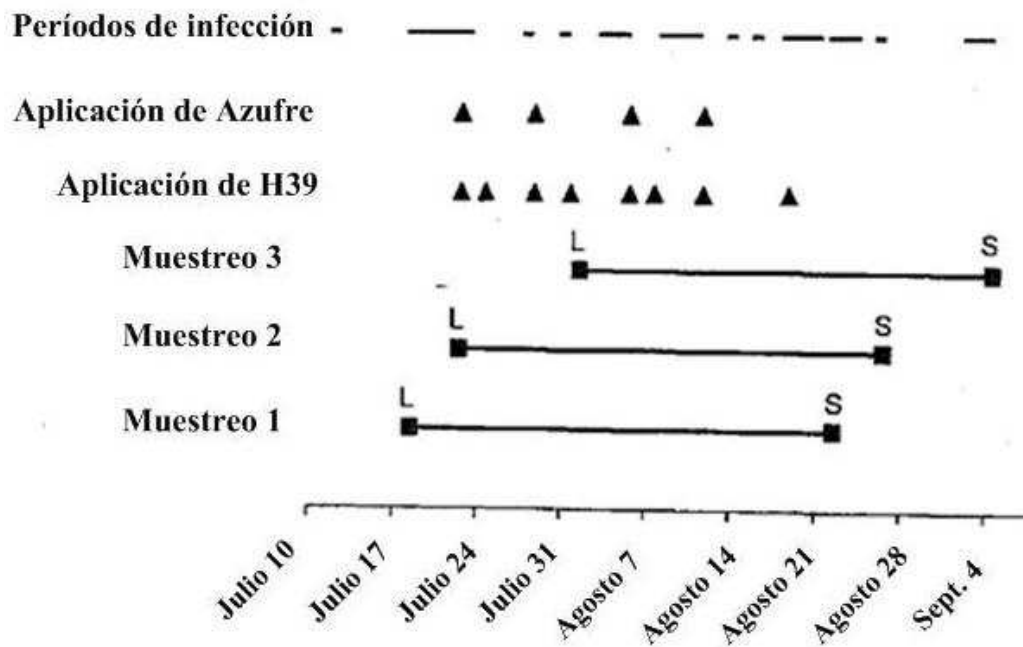


Figura 4

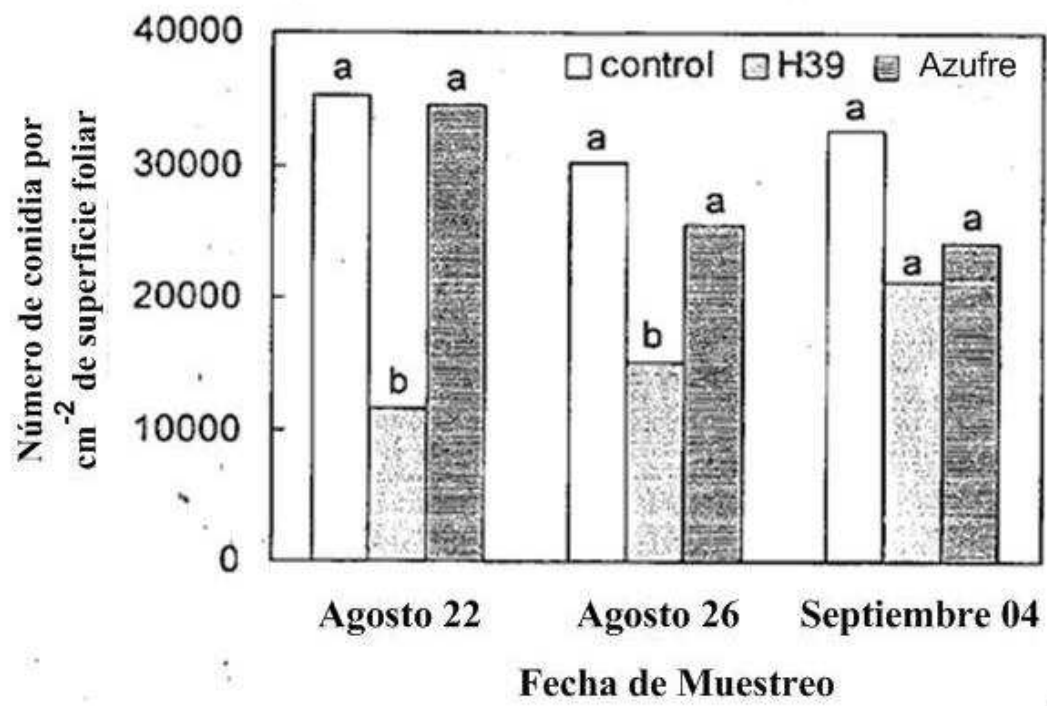


Figura 5

