

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 343**

51 Int. Cl.:

A01P 3/00 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2006** **E 06818504 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015** **EP 1942741**

54 Título: **Composición y método para prevenir los daños provocados por Verticillium en las plantas**

30 Prioridad:

04.11.2005 DE 102005053458

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.08.2015

73 Titular/es:

**LEIBNIZ-ZENTRUM FÜR
AGRARLANDSCHAFTSFORSCHUNG (ZALF) E.V.
(100.0%)
Eberswalder Strasse 84
15374 Müncheberg, DE**

72 Inventor/es:

**LENTZSCH, PETER;
GOLLDACK, JUDITH;
SCHWAERZEL, HILMAR y
SCHUBERT, PETER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 543 343 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

Composición y método para prevenir los daños provocados por *Verticillium* en las plantas

Antecedentes de la invención

- La invención está relacionada con una composición para disminuir y/o prevenir los daños provocados por *Verticillium* sp. en las plantas, que como componente activo comprende una cantidad eficaz de *Verticillium* sp., donde *Verticillium* sp. abarca una cepa no patogénica y una cepa cuya patogenicidad depende de la temperatura y donde se combinan al menos dos cepas de *Verticillium*. La invención también está relacionada con un método para disminuir y/o prevenir los daños provocados por *Verticillium* sp. en las plantas y con el uso de *Verticillium* sp.
- El hongo *Verticillium* sp. provoca el marchitamiento de diversas plantas útiles y ornamentales, lo cual se traduce en una merma en el rendimiento. A causa de los daños económicos significativos que provoca *Verticillium* en las cosechas anuales, se han desarrollado diversas estrategias para combatirlo.
- Con el fin de limitar el potencial nocivo de *Verticillium*, en EP 1 326 494 B1 se describen pseudomicinas que fueron aisladas a partir de bacterias y que son eficaces para tratar las plantas que han sido afectadas por hongos patógenos. En particular, en EP 1 326 494 B1 se describe una terapia que puede aplicarse sobre especies de árboles o de cereales que han sido afectadas por *Verticillium dahliae* en la que se emplean pseudomicinas.
- En DE 199 28 690 A1 se describe un aislado rizobacteriano que se obtiene a partir de *Streptomyces rhimosus*, que resulta útil para fortalecer las plantas y que presenta un efecto fungicida. Este aislado bacteriano da como resultado un incremento en la resistencia de las plantas a diversos hongos que provienen del suelo, como es el caso de *Verticillium* sp.
- Se sabe que *Verticillium* puede tomar la forma tanto de cepas patógenas como de cepas no patógenas. En WO 02/097131 A1 se describen métodos de biología molecular que comprenden aislar ADN a partir de muestras de plantas y amplificarlo por medio de una PCR para diferenciar las cepas patógenas de las cepas no patógenas.
- Por otra parte, se ha intentado correlacionar las infestaciones de *Verticillium*, particularmente el marchitamiento que es provocado por *Verticillium* en las frutillas, con la presencia de un contenido elevado del microesclerocio en el suelo. En este contexto, se ha intentado correlacionar la presencia de ADN propio de *Verticillium* en el suelo para pronosticar los daños que podrían producirse en las plantas de la generación subsiguiente. Sin embargo, se ha determinado que, si se desconoce la patogenicidad de *Verticillium*, la determinación de la presencia del microesclerocio en el suelo por sí sola no resulta útil para pronosticar los daños. Más aun, se ha comprobado que la presencia de ADN de *Verticillium* en el suelo no es una indicación inequívoca de que puedan producirse daños en las plantas. Se han realizado diversos estudios con preparaciones de bacterias líquidas o sólidas para prevenir los daños provocados por *Verticillium*. Si bien el microhábitat del suelo puede verse afectado por las bacterias, es necesario proveerlas en un suministro regular para obtener un efecto duradero.
- La desventaja de los antecedentes técnicos es que los fungicidas biológicos y los fungicidas químicos deben ser aplicados sobre el suelo y sobre las plantas, respectivamente, lo cual da como resultado estrés en las plantas e implica operaciones y costos adicionales. Por otro lado, ni en Alemania ni en la Unión Europea se ha autorizado un medio apropiado para combatir *Verticillium* en las frutillas en el que se empleen agentes químicos útiles para proteger las plantas.

Objetivo de la invención

- Un objetivo de la invención fue proveer una protección eficaz contra las infestaciones de *Verticillium* en las plantas que no estuviera basada en la aplicación de fungicidas externos. Más precisamente, el objetivo fue que esta protección eficaz tuviera una base biológica en lugar de química.

Solución propuesta por la invención

- Sorprendentemente, los presentes inventores han comprobado que determinadas cepas de *Verticillium* pueden resultar apropiadas para disminuir y/o prevenir las infestaciones de las cepas patógenas de *Verticillium* en las plantas útiles. Sin que se desee limitar la invención a una teoría en particular, los inventores han asumido que las cepas de *Verticillium* que se emplean pueden interactuar con las cepas patógenas de *Verticillium* que se encuentran en el suelo, de manera tal de superponerse con ellas o desplazarlas.
- El objetivo de la invención ha sido cumplido con una composición que resulta útil para disminuir y/o prevenir los daños provocados por *Verticillium* sp. en las plantas, que como componente activo comprende una cantidad eficaz de *Verticillium* sp., donde *Verticillium* sp. abarca una cepa no patogénica y una cepa cuya patogenicidad depende de la temperatura y donde se combinan al menos dos cepas de *Verticillium*. En este contexto, resultan particularmente apropiadas las especies *Verticillium dahliae*, *Verticillium longisporum* y *Verticillium albo-atrum*.

En la composición que se ha descrito, se combinan al menos dos cepas de *Verticillium*. Las cepas no patógenas de *Verticillium* son aquellas cepas que no producen ningún efecto dañino sobre las plantas bajo las condiciones

examinadas. La combinación comprende al menos una cepa no patogénica y al menos una cepa cuya patogenicidad depende de la temperatura. La combinación de cepas diferentes tiene la ventaja de que resulta útil para incrementar el efecto de protección sobre las plantas.

5 En otra forma de realización, en las ubicaciones en las cuales la media de la temperatura del suelo es inferior a aproximadamente 15°C, se selecciona una cepa de *Verticillium* cuya patogenicidad depende de la temperatura, que no es patogénica a una temperatura baja pero que es patogénica a una temperatura alta. De esta manera, pueden combatirse las cepas patogénicas que provienen del suelo de una manera independiente de la temperatura. Los ejemplos incluyen los aislados N° 784 y 800.

10 En una forma de realización alternativa, en las ubicaciones en las cuales la media de la temperatura del suelo es de entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 21°C, se selecciona una cepa de *Verticillium* cuya patogenicidad depende de la temperatura, que es patogénica a una temperatura baja pero que no es patogénica a una temperatura alta. Las cepas 292 y 806 resultan particularmente apropiadas.

En las ubicaciones en las cuales la media de la temperatura del suelo es superior a aproximadamente 21°C, resultan particularmente apropiadas las cepas 27, 337 y 840.

15 En otra forma de realización, preferiblemente se emplean los aislados N° 806 (cuyo número de acceso es DSM 17662), 784 (cuyo número de acceso es DSM 17661) y 337 (cuyo número de acceso es DSM 17660).

20 En general, en la selección se tiene en cuenta la similitud genética que hay entre los aislados, los cuales deben ser tan diferentes como resulte posible. Los inventores han asumido que es más probable que los aislados más diferentes puedan colonizar las plantas juntos a causa de las diferencias notables que puede haber en sus exigencias ecológicas.

En otra forma de realización, la composición contiene un vehículo y/o una sustancia auxiliar que pueden ser tolerados por las plantas, como es el caso de la paja. Se ha determinado que la paja del trigo resulta particularmente ventajosa, especialmente para las plantas de frutilla.

25 La paja preferiblemente es sometida a un tratamiento en una autoclave. El tratamiento en la autoclave es útil para destruir los microorganismos competidores, para liberar los nutrientes y para disminuir la duración del cultivo. Una preparación a base de paja que ha sido sometida a diversos tratamientos a 4°C puede ser almacenada durante un período de aproximadamente 4 semanas sin que se vea afectada su eficacia.

En otra forma de realización, la cantidad eficaz de la cepa de *Verticillium* que se emplea es de aproximadamente 5 g del inóculo a base de paja en cada una de las cavidades en las que se siembran las plantas.

30 En una forma de realización alternativa, la cantidad eficaz es de aproximadamente 135 g del inóculo a base de paja por m² y por aproximadamente 10 cm de profundidad, y se la aplica como una inoculación superficial antes de la siembra.

35 A modo de ejemplo, las plantas de frutilla pueden sembrarse hacia fines de Mayo, en un suelo con una temperatura relativamente alta. Estas plantas se inoculan con una cepa *Verticillium* cuya patogenicidad depende de la temperatura, que puede provocar daños en presencia de frío pero que da como resultado un incremento en la vitalidad en presencia de calor. Para efectuar la aplicación en la superficie del suelo, preferiblemente se recurre a un inóculo a base de paja, preferiblemente a base de paja de trigo. Con el objeto de garantizar la acción, también puede usarse otra cepa de *Verticillium*, que por ejemplo, puede ser una cepa no patogénica a cualquier temperatura. Si el objetivo es aplicar una carga preliminar considerable en la ubicación, pueden emplearse múltiples combinaciones de cepas de *Verticillium* adicionales que presentan una relación genética más bien distante. Por otro lado, mediante la inoculación que se aplica sobre las plantas de propagación con el fin de lograr el establecimiento de *Verticillium*, puede disminuirse el esfuerzo en el sitio y puede garantizarse el principio de funcionamiento.

45 En otra forma de realización preferida, la planta es una planta útil, y en particular es una planta de frutilla, de colza, de berenjena, de pimiento, de tomate, de olivo, de pepino, de algodón, de papa, de menta, de alfalfa o de lúpulo. En especial, se prefiere la frutilla y el olivo.

En una forma de realización alternativa, la planta es un árbol ornamental o un árbol del bosque, y en particular es un arce del campo (*Acer campestre*), un arce de Noruega (*Acer platanoides*), un arce blanco (*Acer pseudo-platanus*), un árbol de haba de la India (*Catalpa bignonioides*), un arbusto espinoso (*Cotinus coggygria*), una acacia falsa (*Robinia pseudo-acacia*), un escaramujo (*Rosa canina*), una lila (*Syringa vulgaris*) o una lima (*Tilia cordata*).

50 Por otra parte, la presente invención está relacionada con un método que es útil para disminuir y/o prevenir los daños provocados por *Verticillium* sp. en las plantas, que comprende

- (a) determinar la media de la temperatura del suelo;
- (b) seleccionar una composición que contiene al menos una cepa no patogénica de *Verticillium* y al menos una cepa de *Verticillium* cuya patogenicidad depende de la temperatura en función de la media de la temperatura

del suelo;

(c) aplicar la composición sobre el material vegetal que se desea tratar; y de ser necesario

(d) distribuir el material vegetal inoculado.

- 5 En particular, este método tiene la ventaja de que, además de las bacterias *Verticillium* que ya están presentes en el suelo, no es necesario aplicar fungicidas. En principio, todas las cepas que se emplean están presentes en la ubicación o en la región, por lo que no se recurre a la introducción de especies exóticas.

En un aspecto particularmente ventajoso, el material vegetal puede seleccionarse del grupo que consiste en las semillas, los retoños, los cortes, los brotes, las semillas madre con meristemas agregados, las plantas adultas y las plantas obtenidas a partir de cultivos de tejidos in vitro.

- 10 La invención también está relacionada con el uso de *Verticillium* sp. en la disminución y/o la prevención de los daños provocados por *Verticillium* sp. en las plantas, donde se combina al menos una cepa no patogénica y al menos una cepa cuya patogenicidad depende de la temperatura.

Descripción breve de las figuras

La invención se ilustra con mayor detalle con referencia a las figuras adjuntas, que se describen a continuación.

- 15 En la figura 1a se representa la ubicación de las empresas productoras de frutillas en las que se tomaron muestras del suelo y de las plantas, mientras que en la figura 1b se representa la frecuencia de la colonización de las plantas de frutilla sanas o dañadas por parte de los diversos subtipos genéticos de *Verticillium dahliae* (1-13).
- 20 En la figura 2 se provee el dendrograma que se obtuvo como resultado del procedimiento de RAPD-PCR en el que se analizó la similitud entre las características genéticas de 421 aislados de *Verticillium dahliae*.
- En la figura 3 se representa la acción que presentaron diversos aislados de *Verticillium* sobre la vitalidad de las plantas de frutilla que se desarrollaron a partir de estolones bajo diversas condiciones climáticas.
- 25 En la figura 4 se representa la proporción porcentual con relación al nivel de control que representaron las hojas verdes 14 días después de una inoculación con diversas cepas de *Verticillium*.
- En la figura 5 se representa una parcela en la que se analizaron los daños que fueron provocados por diversas bacterias antagonistas sobre las plantas de frutilla después de una inoculación con diversas cepas de *Verticillium*.
- 30 En la figura 6 se representa una parcela en la que se analizaron los daños con relación al control que se observaron después de la aplicación de una combinación de diversas cepas de *Verticillium*, en presencia o ausencia de paja.

Más adelante se describen diversas formas de realización y diversos análisis específicos.

Descripción detallada de las formas de realización

1. Evaluación de los daños en las plantas

- 35 El daño en las plantas se evaluó en función de los síntomas del marchitamiento. Con este fin, se ha concebido un diagrama de calificación (Büttner, 1985, Untersuchungen zur Methodik der *Verticillium* Resistenzzüchtung und zu züchterischen Möglichkeiten für die Schaffung einer Ausgangsbasis für die Erdbeerzüchtung der DDR, Institut für Obstforschung Dresden-Pillnitz, p. 48) que se extiende entre 1 (que representa una planta muerta) y 9 (que representa una planta sana). Los síntomas del marchitamiento pueden distinguirse fácilmente de los daños de otros tipos. Típicamente, el marchitamiento se produce en las hojas más antiguas y progresa desde el lado exterior al lado interior, hasta que se alcanza un estado completamente necrótico.
- 40

2. Distribución local de *Verticillium* y extensión de los daños

- En diversas ubicaciones, se demostró que el hongo perjudicial *Verticillium* puede hallarse tanto en las plantas sanas como en las plantas fuertemente dañadas (figuras 1a y 1b). Si se compara la colonización en una ubicación, pueden hallarse subtipos diferentes en las plantas sanas y en las plantas dañadas. Sin embargo, como resultado de las comparaciones que se realizaron con subtipos que se hallaron en plantas dañadas en otras ubicaciones, se ha comprobado todos los subtipos son patogénicos. Puede observarse una tendencia en todas las ubicaciones: las plantas dañadas son colonizadas por más subtipos que las plantas sanas. En este caso, los factores que están relacionados con la extensión de los daños todavía no han podido ser determinados. En todo el mundo se están analizando diversos factores relacionados con el cultivo, la acción de diversas preparaciones microbianas antagonistas o el efecto de la adición de diversas sustancias (que por ejemplo, pueden ser sustancias útiles para estimular el crecimiento de las plantas, tales como las giberelinas) o de diversos agentes para inducir resistencia. Si
- 45
- 50

bien se realizó un estudio comparativo con diversas preparaciones microbianas antagónicas en parcelas precisas en Müncheberg, no fue posible obtener un éxito económicamente significativo (la acción en la región fue de 5%).

3. Propiedades del suelo y alcance de los daños

Se analizaron las propiedades del suelo en el que se encontraban las plantas sanas y las plantas dañadas. Con fines comparativos, se examinó un suelo en el que no se habían cultivado plantas. La textura y diversos parámetros químicos difirieron entre el suelo en el que se cultivaron las plantas y el suelo en el que no se realizó cultivo alguno. La proporción C/N fue de prácticamente 10:1 en todos los suelos. Por un lado, esto está asociado a la presencia de una flora en el suelo que está compuesta mayoritariamente por hongos (con una proporción superior a 10:1 para los suelos dominados por los hongos y de 4-6:1 para los suelos dominados por las bacterias), y por otro lado, está asociado a una mayor probabilidad de que se libere el nitrógeno (< 27:1). El nivel más bajo del C, del C orgánico y del N se halló en el suelo de las parcelas (tabla 1), lo cual estuvo asociado a la actividad microbiana más baja. No se halló una correlación entre los parámetros que se analizaron en el suelo y la extensión de los daños en la suma de todas las ubicaciones ni en una ubicación en particular. Se determinó que hubo una correlación significativa ($r = 0,42$) entre el contenido de carbono orgánico y la estructura de las poblaciones de los hongos en el suelo. Si en este contexto se analizan las calificaciones individuales, puede comprobarse que hay una correlación cualitativa: las calificaciones entre 1 y 4 están relacionadas con una población del tipo C, las calificaciones entre 3 y 6 están relacionadas con poblaciones de los tipos J y E y las calificaciones de 5 o 6 están relacionadas con una población del tipo M (las letras caracterizan las estructuras de sendas poblaciones, y la secuencia alfabética está relacionada con las similitudes entre ellas). En el suelo en el que se encuentran las plantas sanas, pueden hallarse poblaciones de los tipos F, A, H y G, las cuales están completamente ausentes en el suelo en el que se encuentran las plantas fuertemente dañadas (que se caracteriza por una calificación de entre 1 y 3).

No fue posible establecer relaciones como las que se han descrito entre las poblaciones de bacterias. Las conclusiones se detallan a continuación.

- La composición estructural de las poblaciones de los hongos en el suelo está correlacionada de manera moderada con el contenido de carbono orgánico en el suelo.
- El contenido de carbono orgánico no está correlacionado con la extensión de los daños.
- La extensión de los daños está relacionada de manera cualitativa con el surgimiento de poblaciones de hongos específicos, y como consecuencia, con el contenido de carbono orgánico en el suelo.
- La extensión de los daños no está relacionada con los parámetros físicos, químicos o microbiológicos.

Tabla 1. Valores característicos de los parámetros del suelo en las superficies de práctica y en la parcela en Müncheberg

Ubicación	CT	NT	C orgánico	P en las plantas	K en las plantas	Mg en las plantas	pH	GS	MS	FS	GU	MU	FU	Arcilla	KAK	Su Kat
Schmergow	0,7	0,07	0,7	8,9	15,3	4,3	5,7	2,6	37,8	37,4	9,4	4,8	2,3	5,6	6,9	3,5
Tieplitz	0,8	0,08	0,7	6,0	14,0	8,8	6,0	1,7	14,3	42,4	19,2	8,7	4,0	9,5	8,4	4,8
Rostock	0,9	0,10	0,9	4,9	14,9	3,6	4,5	3,1	23,8	45,8	13,0	5,2	2,4	6,7	6,8	3,7
Frankfurt	1,0	0,09	1,0	10,3	12,9	4,1	6,3	4,7	34,4	33,8	11,9	5,4	3,4	6,4	8,9	5,9
Pagram	0,9	0,08	0,9	7,9	14,1	9,1	6,1	4,7	37,8	34,6	10,6	4,2	2,4	5,7	6,2	4,2
Schirgiswalde	1,3	0,13	1,3	7,8	16,7	5,8	6,1	1,3	2,4	2,9	48,4	23,6	6,5	14,9	13,5	10,0
Ablaß	1,3	0,13	1,3	12,0	23,3	17,4	6,5	1,4	2,3	3,1	55,9	19,7	4,6	13,0	14,7	11,3
Wallwitz	1,5	0,14	1,4	13,5	29,2	15,9	5,9	1,3	6,3	6,2	42,0	19,0	5,1	20,1	18,9	16,4
Müncheberg	0,8	0,06	0,8	6,9	13,3	6,3	6,0	4,6	34,1	33,4	13,9	5,7	2,8	5,5	6,3	3,9
Parcela	0,5	0,04	0,5	6,5	12,3	3,7	5,9	4,5	32,9	35,6	13,2	5,6	2,7	5,4	6,0	2,8

Ubicación DMSO (actividad de los microbios)

Schmergow	875
Tieplitz	954
Rostock	717
Frankfurt	1086

Pagram	978
Schirgiswalde	902

Ablaß	959
Wallwitz	963
Müncheberg	937
Parcela	512

4. Clasificación de los subtipos de *Verticillium*

La colonización de las plantas sanas y de las plantas dañadas por parte de los hongos dañinos *Verticillium* resulta diferente tanto desde el punto de vista cualitativo como desde el punto de vista cuantitativo. Por medio de un análisis a nivel genético y molecular que se realizó con los hongos que se aislaron, se comprobó la presencia de diversos subtipos genéticos de la especie *V. dahliae*. En este contexto, primero se comprobó si los aislados pertenecían a la especie *Verticillium dahliae*. Para ello, se llevó a cabo un análisis que se basó en los antecedentes y en la información disponible acerca de las secuencias, en el cual se estudiaron las diferencias en la secuencia de la región ITS del ADN ribosomal para poder de diferenciar de manera confiable las especies *V. dahliae*, *V. tricorpus* y *V. albo-atrum*, no solamente entre ellas sino también de otras especies de *Verticillium*, debido a que estas últimas no generan un producto característico en la PCR. Los aislados de *Verticillium dahliae* que se obtuvieron también fueron sometidos a un análisis de RAPD-PCR en el que se empleó un cebador convencional (en 40 ciclos con una temperatura de unión de 36°C). Sobre la base de las características genéticas y moleculares que se estudiaron en un análisis basado en la similitud, fue posible determinar la presencia de 13 subtipos diferentes que se distribuyeron en 2 grupos principales (el resultado se representa en la figura 2; para analizar la similitud, se empleó una correlación de Pearson, se obtuvo un dendrograma con un algoritmo de Ward y se aplicó una optimización de 0,60% y un rango para estudiar las características de entre 13,8% y 60,6%). De esta manera, fue posible determinar cuáles subtipos genéticos colonizaron las plantas sanas y cuáles colonizaron las plantas dañadas y fue posible realizar una caracterización más específica de los subtipos individuales.

5. Patogenicidad de los subtipos de *Verticillium* en función del clima

5.1. Extensión de los daños en plantas que se desarrollaron a partir de estolones en tierra esterilizada

Hacia fines del otoño, se extrajeron plantas de la variedad "Elsanta", que se habían desarrollado a partir de estolones, a partir de un área específica en la parcela de prueba en Müncheberg. El área en la que se realizó el análisis no había sido sometida a ningún tratamiento y había estado libre de daños durante varios años. Mediante la aplicación de un recubrimiento a base de paja a principios del otoño, se eliminaron los estolones cuyas raíces no habían tenido contacto con la tierra. Se removió la porción superior de la tierra de un área adyacente y se exterminó la flora por medio de una esterilización en seco durante varios días. A través de un procedimiento de PCR con múltiples etapas, que como consecuencia fue particularmente sensible, no fue posible comprobar la presencia de ADN propio de *Verticillium*; como resultado del análisis del ARNr 16S o 18S por medio de otro procedimiento de PCR, tampoco fue posible hallar evidencias de ADN propio de las bacterias ni de los hongos.

El estudio se efectuó en recipientes que contenían 340 g de tierra por planta. Los recipientes tenían una altura de 12 cm, de modo tal que el sistema de raíces de la frutilla pudiera establecerse de manera apropiada. Las plantas se evaluaron en una recámara con un clima controlado después de una semana, y solamente se usaron aquellas que comprendieron al menos dos hojas formadas y un cono vegetativo sano. De ser necesario, se cortaron las raíces hasta obtener una longitud de 5 cm.

Se mezcló la tierra (340 g/recipiente) con la preparación de *Verticillium* a base de paja (2 g/planta) y se colocó el producto en bolsas de plástico. Se emplearon 32 subtipos de *Verticillium* que se aislaron a partir las plantas que se habían obtenido en situaciones prácticas o en parcelas. Se incubaron las bolsas de plástico en la recámara con un clima controlado durante 1 semana, se colocó el sustrato alrededor de las raíces de las plantas en los recipientes y se permitió que se solidificara. En función de la primera calificación, que se asignó después de 22 días, se realizó un análisis estadístico de la influencia sobre los dos conjuntos de plantas. No se observaron tendencias ni diferencias entre ellas, por lo que se consideró que se trataba de una única población. Después de un período de entre 42 y 48 días, todas las plantas florecieron, independientemente del programa climático. Las flores se eliminaron para analizar el efecto de *Verticillium* en la etapa vegetativa.

Los diversos programas climáticos fueron puestos en práctica en dos recámaras con un clima controlado que presentaron estructuras idénticas. En uno de los programas, se emplearon condiciones constantes durante la totalidad del estudio, que correspondieron a la media a largo plazo que se había determinado en el período de

cultivo entre fines de Abril y principios de Mayo: estas condiciones se conocerán como “convencionales” (tabla 2). Bajo una iluminación similar, se estableció la temperatura del suelo entre Junio y Agosto de 2004 como un promedio mensual (tabla 2). En la región de Märkisch-Oderland durante el año 2004, la temperatura del aire en el mes de Junio fue 4 K más baja que la media a largo plazo, en Julio fue en promedio 0,5 K más alta y en agosto fue 2,5 K más alta (la información meteorológica se obtuvo entre 1961 y 1990 a partir de las estaciones de Lindenberg, de Berlin-Buch y de Frankfurt (Oder) del Servicio Meteorológico Alemán).

En comparación con el valor de referencia, la temperatura del suelo hasta el mes de Agosto se incrementó de manera gradual un total de 6,6 K durante el día y de 9,3 K durante la noche. El estudio se prolongó durante 10 días hasta fines de Agosto. Debido a que no se observaron más daños, se finalizó el análisis con esta clasificación.

Tabla 2. Programa en la recámara con un clima controlado para las condiciones convencionales y para las condiciones climáticas del año 2004

		Clima convencional		Clima del año 2004	
		Día	Noche	Día	Noche
Junio de 2004	Temperatura del suelo	15,8	12,3	17,5	12,4
	Temperatura del aire	10,1	12,8	12,7	12,3
Julio de 2004	Temperatura del suelo	15,3	12,3	20,6	20,5
	Temperatura del aire	9,9	13,0	15,9	21,1
Agosto de 2004	Temperatura del suelo	14,9	12,2	21,5	21,5
	Temperatura del aire	10,2	12,7	17,9	22,4

En el estudio bajo condiciones convencionales, la vitalidad de las plantas de frutilla, que se analizó después de 50 días o hacia fines de Junio, fue un grado menor que la que se había determinado en el estudio con un clima controlado. La temperatura del suelo en el estudio con un clima controlado fue 3 K más alta durante el día y fue idéntica durante la noche. En cada caso, las dos variables de control difirieron de manera consecuente, por lo cual fue posible estandarizar los resultados en función de los controles. Como consecuencia, los resultados del análisis de la extensión de los daños provocados por *Verticillium* fueron comparables.

Después de 50 días o hacia fines de Junio, perecieron más plantas en el estudio que se realizó bajo condiciones convencionales que en el estudio con un clima controlado. Después de otros 81 días o hacia fines de Julio, perecieron más plantas en el estudio con un clima controlado que en el estudio que se realizó bajo condiciones convencionales.

Se determinó que, en promedio, la extensión de los daños que se produjeron después de 124 días, hasta fines de Agosto más 10 días, dependieron de la cepa que se inoculó y de la temperatura a la que tuvo lugar su adaptación. Bajo las condiciones convencionales, el daño fue máximo después de 50 días y luego se aproximó al nivel de control. Esto es una indicación de una disminución en la colonización o la acción de los hongos, ya que la vitalidad de las plantas de control se mantuvo constante bajo estas condiciones.

En contraste, en el estudio con un clima controlado, el nivel máximo de los daños se observó hacia fines de Agosto, un período en el cual no se habían observado daños adicionales en el estudio bajo condiciones convencionales. La acción de potenciación de la vitalidad fue mayor hacia fines de Junio, un período en el cual ésta se había mantenido constante o había alcanzado el nivel de control en el estudio bajo condiciones convencionales.

Bajo condiciones más frías, los daños alcanzaron un nivel máximo después de 50 días (hacia fines de Junio). Las plantas que sobrevivieron a estos daños pudieron alcanzar el nivel de control después de 124 días (en el mes de Agosto más 10 días).

Bajo las condiciones climáticas propias del año 2004, los daños alcanzaron el nivel máximo hacia fines del mes de Agosto (después de 114 días), y este nivel fue similar al que se había observado bajo condiciones convencionales. Después de otros 10 días, los daños se mantuvieron constantes o tendieron a disminuir.

La extensión de los daños no dependió de manera notable del clima, sino de las cepas que colonizaron las plantas (figura 3).

En función de los resultados que se obtuvieron, las cepas pueden clasificarse como cepas no patogénicas, cepas cuya patogenicidad depende de la temperatura o cepas cuya patogenicidad no depende de la temperatura. Con este propósito, se comparó el nivel máximo de los daños que se observaron después de 50 días (bajo condiciones convencionales) con los daños se observaron hacia fines de Agosto. Las cepas de referencia de Dresden-Pillnitz, 17/89, 22/90 y 32/90, fueron perjudiciales solamente en un suelo con una temperatura más elevada. Si bien las cepas de las áreas de práctica y de las parcelas abarcaban todos los grupos ecológicos, no fue posible hallarlos a todos en las 3 ubicaciones debido a la gran cantidad de muestras al azar que se tomaron. En una planta muy dañada (a la que se le había asignado una calificación de 3), fue posible aislar una cepa no patogénica (544) a partir de 2 tallos de las hojas, una cepa ligeramente patogénica (546) a partir de uno de los tallos y una cepa altamente patogénica (545) a partir de otro tallo.

Cada uno de los tallos de las hojas puede ser colonizado por diversos subtipos, por lo cual la extensión de los daños puede ocurrir de manera específica en cada tallo y puede resultar ventajoso eliminar los tallos de las hojas que se han dañado.

La verificación estadística de los resultados se llevó a cabo tanto después de un período de 124 días como hacia fines de Agosto. De esta manera, fue posible comprobar una acción de potenciación de la vitalidad de significación estadística en el estudio bajo condiciones convencionales pero no en el estudio con un clima controlado. Al final del análisis, se observó el incremento significativo en la vitalidad que se había determinado hacia fines de Junio en el estudio con un clima controlado (por ejemplo, el asociado a la cepa 809).

Se seleccionaron tres cepas no patogénicas de *Verticillium* (793, 801 y 809) para analizar el desarrollo vegetativo de las plantas.

Como resultado de la mortalidad creciente que se observó en las plantas en el estudio con un clima controlado, puede concluirse que los daños fueron mayores que los que se determinaron en el estudio bajo condiciones convencionales, en el cual solamente perecieron unas pocas plantas y las plantas sobrevivientes pudieron recuperarse después de 50 días con daños máximos. Por lo tanto, la cepa 227 parece provocar daños significativos solamente bajo condiciones convencionales.

En resumen, puede concluirse que la colonización de las plantas de frutilla por parte de *Verticillium* no es un hecho indicativo de la presencia de daños. Un proceso de descontaminación química puede deteriorar tanto la población como la materia marchita, pero no es necesario. Más aun, la cantidad de microesclerocio en el suelo no es una indicación confiable de la frecuencia de los daños. En principio, cada uno de los tallos de una hoja puede ser colonizado por cepas de *Verticillium* que pueden caracterizarse por patogenicidades diferentes. Como consecuencia, los aislados que se obtienen a partir de las plantas fuertemente dañadas pueden no ser patogénicos, y del mismo modo, pueden obtenerse aislados altamente patogénicos a partir de las plantas sanas. Este equilibrio microbiológico en la planta depende del clima.

Por consiguiente, se recomienda realizar la siembra bajo las condiciones más frías posibles, y en presencia de un clima más cálido, se recomienda disminuir el desarrollo de daños al mínimo mediante la eliminación de los tallos de las hojas que han sido afectados. Los diversos subtipos patogénicos, incluso los que no dependen del clima, pueden combatirse por medio de una inoculación con subtipos no patogénicos, de ser posible en combinaciones apropiadas. De acuerdo con los resultados que se obtuvieron, puede concluirse que *Verticillium* está presente en poblaciones que se caracterizan por una adaptación ecológica notable al suelo, incluso a temperaturas superiores a las medias a largo plazo. En este contexto, resulta ventajoso usar cepas que solamente provocan daños en presencia de frío.

5.2. Extensión de los daños y similitud genética entre los aislados

Cuando se analizó la relación entre la similitud genética de los aislados y la extensión de los daños que fueron provocados por ellos bajo diversas condiciones meteorológicas, se obtuvieron los siguientes resultados. Los dos grupos genéticos principales (figura 2) presentaron reacciones diferentes. En el grupo principal I, 55% de los subtipos que se estudiaron fueron independientes de la temperatura (50% de ellos no fueron patogénicos), 28% produjeron daños bajo condiciones frías y 17% produjeron daños bajo condiciones más cálidas. A excepción de uno, los subtipos que provocaron daños bajo las condiciones más frías solamente se hallaron en este grupo principal. En el grupo principal II, 80% de los aislados fueron independientes de la temperatura (40% de ellos no fueron patogénicos), 4% produjeron daños en presencia de frío y 16% produjeron daños bajo condiciones más cálidas. Hubo subtipos de los dos grupos genéticos principales en todas las ubicaciones. Por lo tanto, el espectro de *Verticillium* en una localización determinada abarca cepas cuya patogenicidad no depende de la temperatura, cepas cuya patogenicidad depende de la temperatura y cepas no patogénicas.

En función de las condiciones climáticas, otros subtipos también pueden tornarse patogénicos, lo cual complica el combate basado en las interacciones biológicas con las preparaciones microbianas.

5.3. Vitalidad de las plantas de frutilla propagadas a partir de meristemas

Se propagaron 500 plantas de frutilla a partir de meristemas pertenecientes a una línea de producción habitual para Europa (de Häberli, CH) y se seleccionaron 460 de ellas para someterlas al análisis que se describirá más adelante. Las plantas comprendían 2-3 hojas y aparentemente no presentaban una microflora asociada. Estas plantas se transfirieron de manera individual a un medio sintético en matraces Erlenmeyer y se analizaron en recámaras con un clima controlado, bajo condiciones convencionales, para determinar la acción de diversas preparaciones de *Verticillium* a base de paja. La determinación de la temperatura se llevó a cabo por medio de sensores que se hallaban en los matraces Erlenmeyer.

Después de 14 días, los hongos *Verticillium* ocuparon la superficie de las plantas, incluso las hojas verdes, de modo que después de otros 14 días, las plantas se hallaban completamente cubiertas por los hongos, y aquellas afectadas por las variantes patogénicas ya habían muerto. Como consecuencia, el análisis con el que se caracterizó la patogenicidad de las cepas de *Verticillium* se puso en práctica 14 días después de la inoculación (figura 4). Como resultado de una estandarización en función del nivel inicial, fue posible utilizar la proporción que representaron las

hojas verdes después de 14 días como una medida de la vitalidad. Para realizar una verificación estadística, también se analizaron 2 controles independientes, que se localizaron en la primera posición y la tercera posición en la recámara con un clima controlado. La extensión de los daños fue específica para cada una de las cepas y dependió parcialmente del clima. Se determinó que las cepas 429, 227, 542 y 546 fueron cepas altamente patogénicas, cuya patogenicidad no dependió del clima, que las cepas 503 y 66b fueron cepas patogénicas y que las cepas 809, 746 y 799 fueron cepas cuya patogenicidad dependió del clima. Las cepas 27a, 337, 341b, 795, 800, 806, 810 y 17/89 no provocaron daños significativos.

En comparación con el resultado que se obtuvo con las plantas que se habían desarrollado a partir de estolones, se observaron 4 cepas no patogénicas (27a, 337, 795 y 810) y 5 cepas que dieron como resultado daños entre leves y significativos (227, 503, 564, 806 y 17/89). Después de 14 días, se observaron daños dependientes del clima tan solo como una tendencia entre las plantas que fueron propagadas a partir de meristemas: el aislado 806, que había provocado daños bajo condiciones frías entre las plantas que se habían desarrollado a partir de estolones, presentó una acción débil bajo condiciones convencionales, mientras que el aislado 17/89 provocó daños leves de una manera independiente del clima. Se obtuvieron resultados contradictorios para los aislados 341, 429, 66b, 542, 746, 799, 800 y 809, que estuvieron asociados a un clima en particular. Es probable que estos aislados se hayan adaptado a un rango de las temperaturas a las que se realizó el análisis, por lo cual, en este caso, las diferencias microclimáticas entre el sistema basado en estolones que se había usado con anterioridad y el sistema de siembra cerrada en matraces Erlenmeyer que se empleó en este estudio pueden haber resultado decisivas para las plantas que se propagaron a partir de los meristemas.

5.4. Reproducibilidad de la extensión de los daños

La extensión de los daños se calificó de manera visual en plantas que se desarrollaron a partir de estolones, con un protocolo de Freiland que fue similar al que se describe en la publicación de Büttner (1985). En paralelo, se determinó la cantidad de hojas verdes por planta. Estos registros se realizaron en tres momentos que correspondieron a los cambios en el clima: en Junio, en Julio y en Agosto. Con fines comparativos, se analizaron plantas que se propagaron a partir de meristemas en los meses de Junio y Julio. En este caso, se determinó que la calificación de acuerdo con Büttner (1985) no resultó ventajosa, por lo que en su lugar se determinó la cantidad de hojas verdes o amarillentas. Como resultado de la proliferación excesiva de las hojas que se produjo en presencia de los hongos *Verticillium* después de Junio, el experimento finalizó en Julio. Evidentemente, el crecimiento excesivo dio como resultado una mortalidad no específica entre las plantas, probablemente debido a la falta de luz asociada a la gran cantidad de hojas.

Como resultado de los estudios que se realizaron en diversas etapas y bajo diversas condiciones climáticas, no se consideró que fuera posible establecer una extensión unidireccional y reproducible de los daños. Sin embargo, esto sí se observó con 2 aislados: 429 y 542. Los dos no provocaron daños en las plantas que se desarrollaron a partir de estolones, independientemente del clima, pero provocaron daños significativos en las plantas que se propagaron a partir de meristemas (tabla 3).

Bajo condiciones convencionales, 2 cepas presentaron un comportamiento diferente: las cepas 66b y 799 provocaron daños entre medianos y significativos en las plantas que se propagaron a partir de meristemas pero no en las plantas que se desarrollaron a partir de estolones. Bajo las condiciones climáticas del año 2004, las cepas 800 y 809 provocaron daños de diversos tipos: la cepa 800 provocó daños débiles entre las plantas que se desarrollaron a partir de estolones pero no provocó daños en las plantas que se propagaron a partir de meristemas, mientras que la cepa 809 no provocó daños entre las plantas que se desarrollaron a partir de estolones y provocó daños medios entre las plantas que se propagaron a partir de meristemas. 6 cepas presentaron una acción no patogénica (27a, 337, 341, 795, 810 y 17/89), mientras que 5 provocaron daños entre leves e importantes (227, 503, 564, 746 y 806).

Con los dos métodos de análisis, pueden diferenciarse las cepas no patogénicas de las cepas patogénicas de una manera reproducible.

En el estudio con las plantas que se propagaron a partir de meristemas, fue posible obtener resultados útiles tan solo después de 14 días, en comparación con los 4 meses que fueron necesarios con las plantas que se desarrollaron a partir de estolones.

Las diferencias entre los resultados que se obtuvieron en los estudios pueden haberse debido a la colonización de las plantas por parte de los microbios y al tamaño de las plantas. Debido a estas diferencias, fue posible observar daños entre las plantas que se propagaron a partir de meristemas pero no entre las plantas que se desarrollaron a partir de estolones.

En el estudio con las plantas que se propagaron a partir de meristemas, también se aplicaron micorrizas en combinación con las cepas 429 y 809. Cuando se recurrió a la combinación con la cepa 429, las plantas presentaron calificaciones 20% más bajas, mientras que cuando se recurrió a la combinación con la cepa 809, no se observaron cambios: esto también se observó en el estudio con las plantas que se desarrollaron a partir de estolones.

Cuando se analizaron aislados provenientes de plantas de frutilla de otros tipos, es decir, la cepa 800, que proviene

5 de "Korona" (a la que se le había asignado una calificación de 9), las cepas 292 (a la que se le había asignado una calificación de 3), 810 y 840 (a las que se les había asignado una calificación de 9), que provienen de "Symphonie", y la cepa 793, que proviene de "Yamaska" (a la que se le había asignado una calificación de 9), en "Elsanta", se observaron daños diferentes. Solamente la cepa 840 de "Symphonie" y la cepa 793 de "Yamaska" no resultaron patógenas en "Elsanta". Incluso si se recurre a una siembra recurrente de "Elsanta" en lotes sanos de "Symphonie" o de "Korona" y se asume que se incrementará la proporción de cepas de *Verticillium* no patógenas, no puede garantizarse la obtención de plantas de "Elsanta" sanas.

Tabla 3. Reproducibilidad de los daños que pueden ser provocados por las cepas de *Verticillium* entre las plantas desarrolladas a partir de estolones y entre las plantas propagadas a partir de meristemas

Plantas desarrolladas a partir de estolones		Plantas propagadas a partir de meristemas			
	Clima convencional	Clima del año 2004	Clima convencional	Clima del año 2004	Daños
Control	0	0	0	0	
27a	0	0	0	0	0
66b	0	daños observables	daños observables	daños observables	-
227	daños observables	daños observables	daños observables	daños observables	daños generales
337	0	0	0	0	0
341	0	daños entre débiles y nulos	0	0	0
429	0	0	daños observables	daños observables	-
503	daños observables	daños observables	daños observables	daños observables	daños generales
542	0	0	daños observables	daños observables	-
564	daños observables	daños observables	daños observables	daños observables	daños generales
746	0	daños entre débiles y nulos	daños débiles	daños entre débiles y nulos	daños débiles
795	daños entre débiles y nulos	daños entre débiles y nulos	daños entre débiles y nulos	daños entre débiles y nulos	0
799	0	daños entre nulos y débiles	daños observables	daños observables	-
800	0	daños débiles	daños entre débiles y nulos	0	-
806	daños débiles	0	daños débiles	0	daños débiles asociados al frío
809	0	0	0	daños medios	-
810	daños entre débiles y nulos	0	daños entre débiles y nulos	0	0
17/89	0	daños entre débiles y nulos	0	daños entre débiles y nulos	0

6. Estudios en parcelas precisas

En los estudios en parcelas, se estableció que la combinación de diversas cepas de *Verticillium* con diversas preparaciones de origen bacteriano que se encuentran disponibles en el ámbito comercial fue útil para promover la vitalidad o para obtener una acción agónica (figura 5). A modo de ejemplo, la preparación bacteriana 7W (HRO-7W1) dio como resultado una disminución en los daños cuando se la combinó con la cepa de *Verticillium* 16. Cuando se combinó la cepa de *Verticillium* 33 con la preparación 7W, el daño se duplicó.

En otro estudio, se analizó la acción combinada de diversas cepas de *Verticillium* sobre el desarrollo de los daños en las plantas de frutilla. Si bien mediante la inoculación con mezclas de diversas cepas de *Verticillium*, por separado o combinadas, sorprendentemente no se produjo un incremento en los daños, con una combinación específica (que abarcó las cepas 10, 17 y 22), se produjo una disminución en los daños hasta al mitad (figura 6), incluso cuando la inoculación de las cepas 10 y 17 por separado había dado como resultado un incremento en los daños. De esta manera, fue posible demostrar que la extensión de los daños provocados por cepas de *Verticillium* desconocidas en el suelo puede disminuirse de manera notable por medio de una inoculación selectiva con cepas de *Verticillium* seleccionadas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para disminuir y/o prevenir los daños provocados por *Verticillium* sp. en las plantas caracterizada porque como componente activo comprende una cantidad eficaz de *Verticillium* sp., donde *Verticillium* sp. abarca una cepa no patogénica y una cepa cuya patogenicidad depende de la temperatura y donde se combinan al menos dos cepas de *Verticillium*.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque, en las ubicaciones en las cuales la media de la temperatura del suelo es inferior a aproximadamente 15°C, se selecciona una cepa de *Verticillium* cuya patogenicidad depende de la temperatura, que no es patogénica a una temperatura baja pero que es patogénica a una temperatura alta.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque, en las ubicaciones en las cuales la media de la temperatura del suelo es de entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 21°C, se selecciona una cepa de *Verticillium* cuya patogenicidad depende de la temperatura, que es patogénica a una temperatura baja pero que no es patogénica a una temperatura alta.
4. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque *Verticillium* sp. se selecciona entre los aislados N° 806 (cuyo número de acceso es DSM 17662), 784 (cuyo número de acceso es DSM 17661) y 337 (cuyo número de acceso es DSM 17660).
5. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque contiene un vehículo y/o una sustancia auxiliar que pueden ser tolerados por las plantas, particularmente paja.
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque la paja es sometida a un tratamiento en una autoclave antes de usarla.
7. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la cantidad eficaz es de aproximadamente 5 g del inóculo a base de paja en cada una de las cavidades en las que se siembran las plantas.
8. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque la cantidad eficaz es de aproximadamente 135 g del inóculo a base de paja por m² y por aproximadamente 10 cm de profundidad, y se la aplica como una inoculación superficial antes de la siembra.
9. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la planta es una planta útil, y en particular es una planta de frutilla, de colza, de berenjena, de pimiento, de tomate, de olivo, de pepino, de algodón, de papa, de menta, de alfalfa o de lúpulo.
10. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque la planta es un árbol ornamental o un árbol del bosque, y en particular es un arce del campo (*Acer campestre*), un arce de Noruega (*Acer platanoides*), un arce blanco (*Acer pseudo-platanus*), un árbol de haba de la India (*Catalpa bignonioides*), un arbusto espinoso (*Cotinus coggygria*), una acacia falsa (*Robinia pseudo-acacia*), un escaramujo (*Rosa canina*), una lila (*Syringa vulgaris*) o una lima (*Tilia cordata*).
11. Un método para disminuir y/o prevenir los daños provocados por *Verticillium* sp. en las plantas, CARACTERIZADO PORQUE comprende
 - (a) determinar la media de la temperatura del suelo;
 - (b) seleccionar una composición que contiene al menos una cepa no patogénica de *Verticillium* y al menos una cepa de *Verticillium* cuya patogenicidad depende de la temperatura en función de la media de la temperatura del suelo;
 - (c) aplicar la composición sobre el material vegetal que se desea tratar; y de ser necesario
 - (d) distribuir el material vegetal inoculado.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE el material vegetal se selecciona del grupo que consiste en las semillas, los retoños, los cortes, los brotes, las semillas madre con meristemas agregados, las plantas adultas y las plantas obtenidas a partir de cultivos de tejidos in vitro.
13. El uso de *Verticillium* sp. CARACTERIZADO PORQUE es en la disminución y/o la prevención de los daños provocados por *Verticillium* sp. en las plantas, donde se combina al menos una cepa no patogénica y al menos una cepa cuya patogenicidad depende de la temperatura.

Plantas sanas Plantas dañadas
(calificación 7 – 9) (calificación 1 – 6)

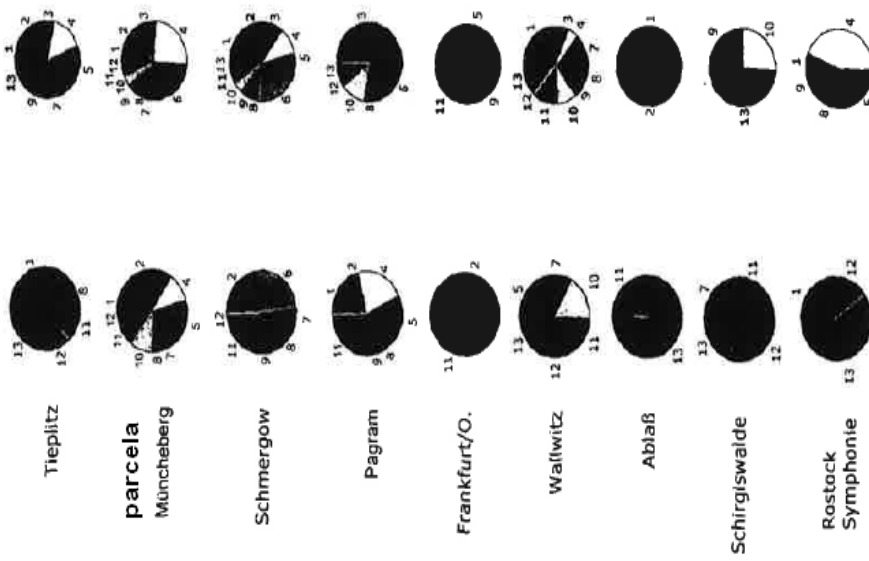


Figura 1b

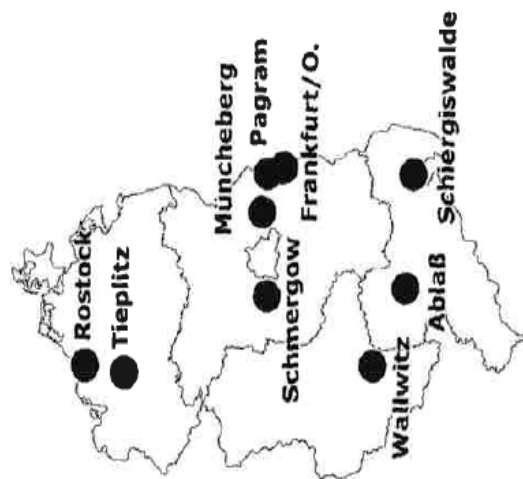


Figura 1a

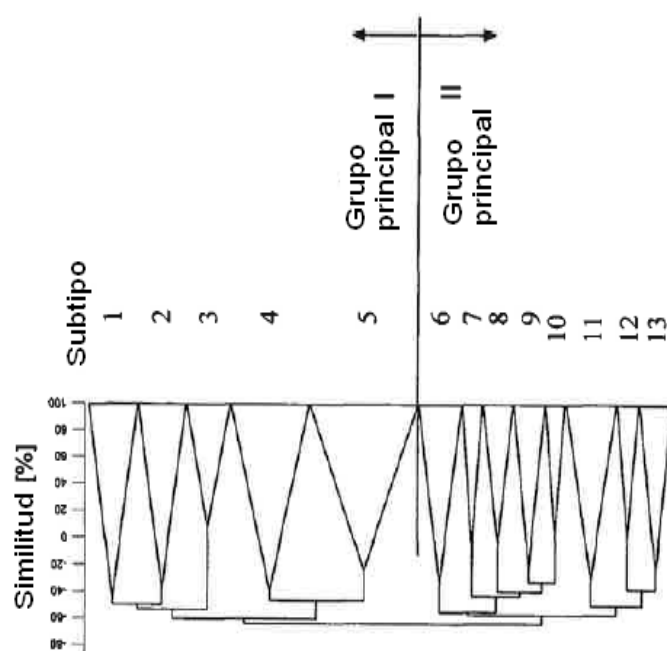


Figura 2

Cambio máximo en la vitalidad con relación al control, bajo condiciones climáticas convencionales o bajo condiciones climáticas controladas

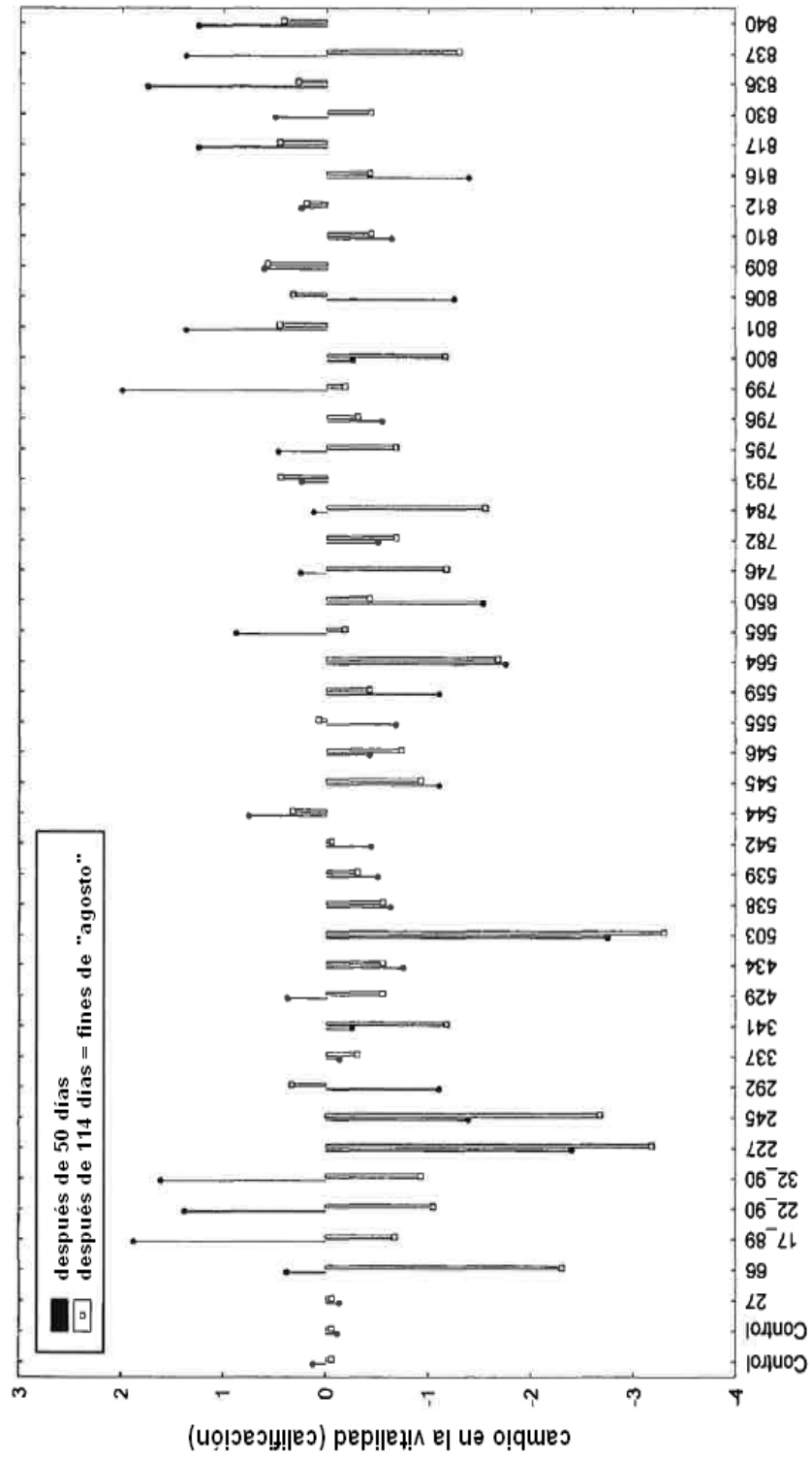


Figura 3

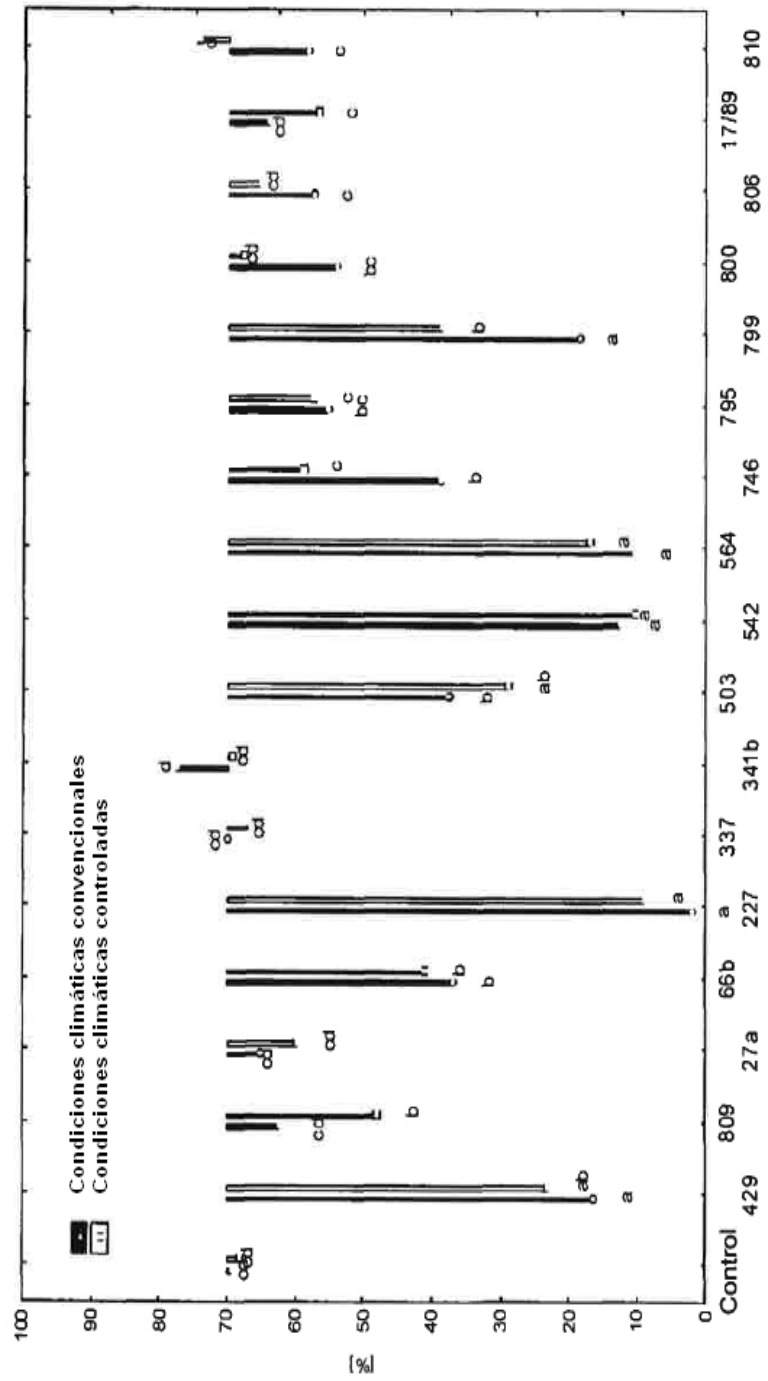


Figura 4

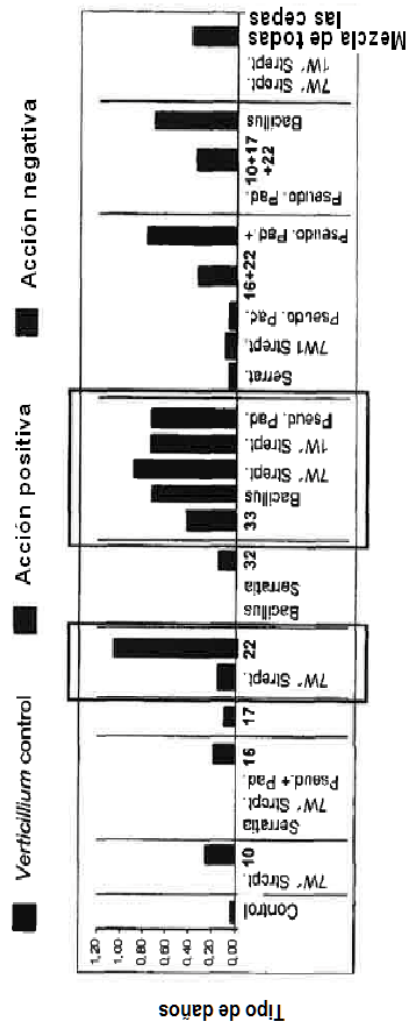


Figura 5

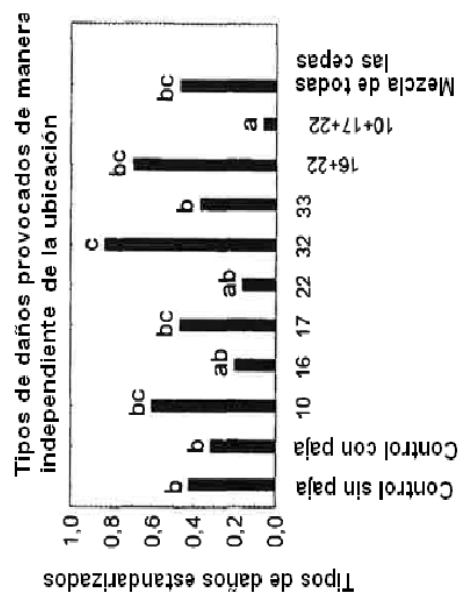


Figura 6