

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 363**

21 Número de solicitud: 201530448

51 Int. Cl.:

A01N 63/02 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

A01G 17/02 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

01.04.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.08.2015

71 Solicitantes:

**VIVEROS VILLANUEVA VIDES, S.L. (100.0%)
Vista Alegre, s/n
31251 Larraga (Navarra) ES**

72 Inventor/es:

**ÁLVAREZ PÉREZ, José Manuel;
GONZÁLEZ GARCÍA, Sandra;
COBOS ROMÁN, Rebeca;
OLEGO MORÁN, Miguel Ángel;
GARZÓN JIMENO, José Enrique y
RUBIO COQUE, Juan José**

74 Agente/Representante:

TORO GORDILLO, Francisco Javier

54 Título: **Producto para el control de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades de madera de vid y procedimiento para su aplicación en injertos de vid**

57 Resumen:

Producto para el control de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades de madera de vid y procedimiento para su aplicación en injertos de vid.

Se trata de 3 cepas de actinobacterias pertenecientes al género *Streptomyces* y denominadas *Streptomyces* sp.VV/R1, *Streptomyces* sp. VV/R4 y *Streptomyces* sp. VV/E1.

Las cepas VV/R1 y VV/R2 se han aislado a partir de rizosfera de vid, mientras que la cepa VV/E1 es una cepa endofítica aislada del interior de raíz, en ambos casos obtenidas de plantas de vid de una edad de 1 año. Estas cepas se seleccionaron en base a su capacidad para inhibir de forma efectiva en ensayos in vitro e injertos de vid en vivero el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Ilyonectria* sp., *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum*, señalados por numerosos estudios como los principales responsables del decaimiento de plantas jóvenes de vid, a las que pueden infectar a través del sistema radicular.

ES 2 543 363 A1

PRODUCTO PARA EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS CAUSANTES
DE ENFERMEDADES DE MADERA DE VID Y PROCEDIMIENTO PARA SU
APLICACIÓN EN INJERTOS DE VID

5

DESCRIPCIÓN

OBJETO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a la selección de actinobacterias de la rizosfera de vid (*Vitis vinífera*) o actinobacterias endofíticas aisladas del interior de raíz de plantas de vid para disminuir el grado de infección de hongos causantes de enfermedades de madera de vid a través del aparato radicular mediante su aplicación a injertos de vid antes de su establecimiento en vivero.

15

El objeto de la invención es proporcionar una tecnología económica, de fácil aplicación, y que puede ser aplicada durante el proceso de producción industrial de plantas de vid en vivero, o incluso que pueda ser aplicada a viñedos adultos ya

establecidos en campo a fin de evitar o disminuir el riesgo de infección a través del aparato radicular por hongos fitopatógenos causantes de enfermedades de madera de vid.

- 5 El método de la invención encuentra especial aplicación en los viveros de plantas de vid a fin de producir plantas con un mejor estado sanitario o en empresas dedicadas a la producción de uva, tanto de mesa como dedicadas a la elaboración de vino.

De acuerdo con el método, se ha comprobado una disminución en los niveles de
10 infección de plantas tratadas que oscila entre el 73.1 y el 76.9% por los hongos fitopatógenos *Ilyonectria* sp., *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum*, cuando se compara con el nivel de infección detectado en injertos de vid control sin tratar con actinobacterias.

También se ha observado una disminución de la mortalidad de injertos de vid en la
15 fase de establecimiento del vivero en tierra para la producción de plantas de vid que oscila entre el 5.4% y el 12.4% por comparación con el grado de mortalidad observado en lotes de plantas control sin tratar.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Desde principios de los años 90 del siglo XX los síntomas de enfermedades de madera de vid en viñedos jóvenes (decaimientos de la vid), así como los fallos en el material de plantación han venido suponiendo importantes pérdidas económicas a nivel mundial para el sector vitivinícola. Actualmente se considera que los hongos causantes de enfermedades de madera de vid como el pie negro, la enfermedad de Petri o los síndromes producidos por especies de la familia Botryosphaeriaceae son uno de los factores que contribuyen de manera más significativa a los decaimientos de plantas jóvenes de vid [Gramaje y Armengol, 2011, Plant Dis. 95, 1040-1055].

Entre los síntomas observados destacan bajos rendimientos de producción de bayas, sarmientos raquíuticos y deficiente desarrollo y escaso desarrollo del aparato radicular con la aparición de lesiones necróticas, tanto en raíz como en sarmientos. Estos síntomas desembocan en un acusado retardo del crecimiento de las plantas y con elevada frecuencia en la muerte prematura.

Las principales patologías asociadas al decaimiento de plantas jóvenes de vid son el pie negro, producido por distintas especies del género *Ilyonectria* (antiguamente *Cylindrocarpon*) [Hallen et al., 2006, Phytopathol. Mediterr. 45, S55– S67] y la

enfermedad de Petri, producida fundamentalmente por los hongos *Phaeoconiella chlamydospora* y distintas especies del género *Phaeoacremonium* [Mundy and Manning, 2010, New Zealand Plant Protection 63: 160-166].

- 5 Diferentes estudios han demostrado que muchas de las plantas afectadas se habían infectado en el vivero durante las distintas etapas de producción industrial de plantas de vid. De hecho se han identificado varios momentos o etapas del proceso en los que se puede producir la contaminación del material empleado para la producción de plantas de vid, fundamentalmente 1).- la infección de las plantas
- 10 madre de variedades americanas, a partir de las cuales se producen los portainjertos; 2).- infecciones producidas durante las etapas de injertado y formación del callo entre el portainjertos y la variedad; 3).- infecciones producidas durante la fase de establecimiento del vivero en tierra [Gramaje y Armengol, 2011, Plant Dis. 95, 1040-1055].

15

La infección durante el proceso de propagación en vivero es un problema de gran importancia, puesto que de esta manera se introducen los patógenos en el ciclo de producción de la planta. El papel de los viveros de vid como origen de la

contaminación de un número elevado de plantas ha quedado demostrado por Aroca et al. [Aroca et al., 2006, Eur. J. Plant Pathol. 115: 195-202] que en un rastreo realizado en plantas injertadas y patrones de variedades americanas comprobaron que el 45.2% de las plantas estaban infectadas con algún hongo asociado al decaimiento de la vid, especialmente las especies responsables de la enfermedad de Petri.

En otro estudio [Giménez-Jaime et al., 2006, J. Phytopathol. 154: 598– 602] realizado en 6 viveros de la Comunidad Valenciana comprobaron la presencia de hongos causantes de enfermedades de madera en todos los viveros analizados. De forma más concreta *Cylindrocarpon* spp., *Botryosphaeria* spp. y *B. obtusa* (*D. seriata*) se aislaron preferentemente en material vegetal correspondiente a fases tempranas del proceso de producción (patrones de la variedad americana y zona del injerto en plantas injertadas antes de ser plantadas en suelo) en porcentajes que oscilaban del 0.48-2.38% de las plantas analizadas. Por el contrario *P. chlamydospora* y *P. aleophilum* no se detectaron hasta que las estaquillas fueron plantadas en el campo para desarrollar raíces y brotes (parte aérea), con porcentajes de infección oscilando entre 0-7.62% de las plantas analizadas.

El problema no es exclusivo de viveros en España. De hecho *Cylindrocarpon* spp. ha sido aislado en Sudáfrica de las plantas madre de los portainjertos y en este país y California este género es considerado el patógeno más importante en viveros [Hallen et al., 2003, Australas. Plant Pathol. 32: 47-52.; Fourie y Hallen, 2004, Australasian Plant Pathol. 33: 313-315; Dubrovsky y Fabritius, 2007, Phytopathol. Mediterr. 46: 46-86].

Los hongos fitopatógenos más importantes señalados como responsables del decaimiento de plantas jóvenes de vid tienen en común su capacidad para infectar las plantas a través del sistema radicular. Así se ha demostrado la presencia de los hongos responsables de la enfermedad de pie negro en el suelo [Agustí-Brisach et al., 2014, Plant Pathol., 63: 316– 322]. Los hongos pueden permanecer aquí durante largos periodos de tiempo (en forma de clamidosporas o de forma saprofítica) y penetrar en la planta a través de las raíces, ya desde la fase de enraizamiento en vivero. Una adecuada gestión del suelo puede reducir significativamente el riesgo de infección a través de la raíz. También se ha demostrado la capacidad de *P. chlamydospora* y *P. aleophilum* de utilizar esta vía

de entrada para infectar injertos. De hecho, Giménez-Jaime y colaboradores [Giménez-Jaime et al., 2006, J. Phytopathol. 154: 598– 602] han descrito que estas dos especies sólo pudieron ser aisladas de injertos dos meses después de ser plantados en el vivero. Todos estos estudios confirman que estos hongos patógenos
5 pueden infectar los injertos a través del aparato radicular que se desarrolla en el vivero.

En los últimos años se han desarrollado numerosos estudios encaminados a reducir el riesgo de infección de plantas de vid en vivero mediante el empleo de distintas
10 estrategias como el uso de distintos fungicidas químicos, tratamientos del material vegetal con agua caliente, biocontrol o el desarrollo de variedades de portainjertos más resistentes a la infección [para una revisión ver Gramaje y Armengol, 2011, Plant Dis. 95, 1040-1055].

15 El biocontrol es una de las tecnologías más prometedoras para el control de muchas patologías sin tener que recurrir al empleo de pesticidas de síntesis química, de elevada toxicidad en muchos casos y que con frecuencia han mostrado ser perjudiciales para el medio ambiente y/o los seres vivos. En viveros de vid se han

realizado diferentes pruebas con agentes de biocontrol (BCA). Así Fourie y colaboradores mostraron que la aplicación de diferentes cepas del hongo *Trichoderma* tenían un efecto positivo para prevenir la infección por *Cylindrocarpon* spp., *P. chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. De hecho se observaron niveles

5 menores de estos hongos en las raíces de plantas tratadas en vivero [Fourie et al., 2001, Phytopathol. Mediterr. 40S: 473-478]. También se ha ensayado en viveros de vid BCA *Trichoderma harzianum* para controlar la infección por *P. chlamydospora*. El BCA se aplicó de distintas maneras: mediante inmersión de la masa radicular en una suspensión de esporas, mediante inmersión de los tallos que se injertan en el

10 pie de planta para que formen el callo en suspensión de esporas o mediante una combinación de ambos. El BCA mostró cierta eficacia promoviendo el desarrollo del sistema radicular e incrementando el porcentaje de plantas que sobrevivían a la infección con el patógeno. Sin embargo, también como efecto adverso se observó un incremento en la mortalidad de las plantas tratadas con el BCA [De Marco y Osti,

15 2007, Phytopathol. Mediterr. 46: 73-83], por lo que la eficacia de la aplicación de BCA del género *Trichoderma* permanece en entredicho.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La tecnología que se preconiza está concebida para resolver un punto concreto de la problemática anteriormente expuesta, concretamente reducir o limitar al máximo la infección de injertos de vid en vivero a través del aparato radicular durante la fase del establecimiento del vivero de injertos en suelo, momento en que éstos desarrollan el aparato radicular. Para ello nos basamos en el empleo como agentes de control biológico (BCAs) de 3 cepas seleccionadas de actinobacterias, cuando son aplicadas a los injertos de vid

10

A).- Cepas *Streptomyces* sp. VV/E1, VV/R1 y VV/R4: descripción.

En un aspecto la invención se relaciona con 3 cepas de actinobacterias pertenecientes al género *Streptomyces* sp. seleccionadas a partir de la rizosfera (cepas VV/R1 y VV/R4) o del interior de raíz (cepa VV/E1) de plantas de vid de una edad de 1 año y que muestran una alta efectividad para inhibir el crecimiento, tanto en ensayos *in vitro* como en material vegetal, de los hongos fitopatógenos *Ilyonectria* sp., *P. chlamydospora* y *P. aleophilum*, principales responsables del decaimiento de plantas jóvenes de vid y varias enfermedades de madera de vid.

Los cultivos respectivos de las cepas de *Streptomyces* sp. denominados VV/E1, VV/R1 y VV/R4 están conservadas y depositadas de forma permanente en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), ubicada en Universidad de Valencia; Edificio de investigación; Campus de Burjassot; 46100-Burjassot (Valencia), con los números de acceso respectivos CECT 8852; CECT 8853 y CECT 8854.

Las cepas *Streptomyces* sp. VV/E1, VV/R1 y VV/R4 presentan entre otras las siguientes características que se indican a continuación:

10

I).- Cepa VV/E1.- La secuenciación del ADN ribosomal (ADNr) 16S concluyó que se trata de una cepa de *Streptomyces* que pertenece al grupo taxonómico *S. capillispiralis-S. cellulosae-S. gancidicus-S. pseudogriseolus-S. werraensis*, siendo indistinguible en base a la secuencia del ADNr 16S, ya que muestra una homología del 100%.

15

La cepa VV/E1 tiene buen crecimiento en los medios ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6, MBA, MEY, TBO y 2xTY. Esta cepa tiene una muy baja capacidad de

esporulación en medios ISP3 y TBO, no esporulando en medios ISP1, ISP2, ISP4, ISP5, ISP6, MBA, MEY, y 2XTY.

Morfológicamente en placas de medio ISP2 presenta colonias con coloración marrón claro, de morfología rugosa o estriada y con un abultamiento en el centro.

II).- Cepa VV/R1.- La secuenciación del ADN ribosomal (ADNr) 16S concluyó que se trata de una cepa de *Streptomyces* que pertenece al grupo taxonómico *S. peucetius-S. kursanovi-S. xantholiticus*, siendo indistinguible en base a la secuencia del ADNr 16S, ya que muestra una homología del 100%.

La cepa VV/R1 tiene buen crecimiento en los medios ISP1, ISP2, ISP3, ISP5, ISP6, MBA, MEY, TBO y 2xTY, mostrando un menor crecimiento en medio ISP4. Esta cepa tiene una baja capacidad de esporulación en medio MEY, no esporulando aparentemente en medios ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6, MBA, TBO y 2xTY.

En placas de medio ISP2 morfológicamente se caracteriza por presentar una coloración rosácea, con morfología rugosa, cierta concentricidad en su crecimiento

con un abultamiento en el centro.

II).- Cepa VV/R4.- La secuenciación del ADN ribosomal (ADNr) 16S concluyó que se trata de una cepa de *Streptomyces* que pertenece al grupo taxonómico *S.*

5 *capillispiralis-S. cellulosae-S. gancidicus-S. pseudogriseolus-S. werraensis*, siendo indistinguible en base a la secuencia del ADNr 16S, ya que muestra una homología del 100%.

La cepa VV/R1 tiene buen crecimiento en los medios ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5,
10 MBA, MEY, TBO y 2xTY, mostrando un menor crecimiento en medio ISP6. Esta cepa tiene una muy baja capacidad de esporulación en medio ISP4; capacidad de esporulación baja en medio ISP1, ISP7 y MBA; capacidad de esporulación media en ISP3 y MEY; capacidad esporulación alta en medio ISP2 y TBO. No muestra capacidad de esporulación en medio ISP5 y 2xTY.

15

Morfológicamente en placas de medio ISP2 se caracteriza por producir colonias de un color beige oscuro, con morfología plana y de crecimiento concéntrico. Tienden a esporular en este medio (color blanco).

B).- Aislamiento de las cepas *Streptomyces* sp. VV/R1, VV/R4 y VV/E1.

Las mencionadas cepas han sido aisladas y seleccionadas de entre un total de 85 cepas de actinobacterias rizosféricas y 66 cepas endofíticas analizadas. Dichas

5 cepas se aislaron a partir de muestras de rizosfera de raíz en medio almidón y caseína o del interior de raíz de vid, de acuerdo a la metodología descrita por Li y colaboradores [Li et al., 2012, Ant. Van Leeuwenhoek. 101:515-527]. Las muestras de suelo de rizosfera o de material radicular fueron diluídas sucesivamente en solución salina (NaCl 0.9%) estéril. Las diluciones se plaquearon en medio con

10 almidón y caseína conteniendo cicloheximida y ácido nalidíxico para inhibir selectivamente el crecimiento de hongos y bacterias Gram(-) respectivamente. Las placas se incubaron 7 días a 28°C. Seguidamente todas las colonias con una típica morfología de actinobacterias (desarrollo micelial, aspecto aterciopelado o cereo, posible producción de micelio aéreo con o sin exosporas y posibilidad de producción

15 de pigmentos difusibles en el medio de cultivo) fueron replicadas a medio extracto de levadura-extracto de malta (MEY) [Hopwood et al., 1985, Genetic manipulation of *Streptomyces* — A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, UK and Cold Spring Harbour Laboratory]. . La confirmación provisional de su pertenencia al

grupo de las actinobacterias se realizó mediante determinación de su morfología filamentosa tras observación al microscopio óptico.

C).- Selección de las cepas *Streptomyces* sp. VV/R1, VV/R4 y VV/E1.

Las cepas VV/R1, VV/R4 y VV/E1 pueden ser empleadas en la obtención de plantas de vid injertadas en viveros de vid con un nivel medio de infección por hongos causantes de enfermedades de madera (particularmente *Ilyonectria* sp., *P. chlamydospora* y *P. aleophilum*) mucho menor. Esta aplicación permitiría a la empresa solicitante disponer de un material vegetal con un estado sanitario muy mejorado.

10

Estas cepas pueden ser empleadas de manera individual o conjunta, en diferentes combinaciones, para su aplicación en injertos de vid mediante inclusión en la solución de hormona de enraizamiento o para la aplicación a plantas jóvenes y adultas en campo mediante su aplicación al sistema radicular por fertirrigación u otras técnicas de riego o vitícolas, con el fin de controlar la infección de plantas de vid por estos hongos fitopatógenos a través del aparato radicular.

15

El empleo de las cepas VV/R1, VV/R4 y VV/E1 en la obtención de plantas de vid injertadas proporciona numerosas ventajas. En particular su empleo en viveros de vid permite la obtención de plantas con un mejor estado sanitario al disminuir el nivel de infección por hongos causantes de enfermedades de madera. Estas plantas, por su mejor estado sanitario, serán menos susceptibles de sufrir posteriores infecciones una vez plantadas definitivamente en campo, especialmente si se realizan aportaciones periódicas de estos microorganismos al sistema radicular mediante fertirrigación o por cualquier otra técnica alternativa. La implantación de estos microorganismos en la rizosfera de plantas o en el interior del sistema radicular evitará o limitará la infección por cualquier hongo susceptible a los mecanismos antifúngicos o compuestos producidos por ellas.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que seguidamente se va a realizar y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter

ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La figura 1.- Muestra una gráfica correspondiente al descenso en el nivel medio de mortalidad observado en injertos de vid establecidos en vivero en campo tras la aplicación de las actinobacterias seleccionadas VV/E1, VV/R1 y VV/R4 por comparación con el nivel medio de mortalidad observado en plantas control no tratadas.

La figura 2.- Muestra una gráfica correspondiente al descenso relativo (%) de los hongos patógenos *Ilyonectria* sp., *P. chlamydospora* y *P. aleophilum* observado en injertos de vid establecidos en vivero en campo tras la aplicación de las actinobacterias seleccionadas VV/E1, VV/R1 y VV/R4 por comparación con el nivel medio de infección observado en plantas control no tratadas.

15

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

Los ejemplos siguientes ilustran la invención, aunque no deber ser considerados

limitativos del alcance de la misma.

* Ejemplo 1. Obtención y caracterización de las cepas VV/R1, VV/R4 y VV/E1.

Un total de 85 cepas de actinobacterias rizosféricas y 66 cepas endofíticas aisladas de plantas de vid de 1 año fueron diferenciadas en función de rasgos morfológicos fácilmente apreciables (color y morfología de la colonia, capacidad para formar micelio aéreo, capacidad para esporular, producción de pigmentos solubles y difusibles en el medio de cultivo). Todas estas cepas fueron ensayadas para su capacidad para inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Ilyonectria* sp. y *Diplodia seriata* por su crecimiento agresivo. Para ello se utilizó la técnica del bioensayo. Todas las cepas se crecieron a 28°C en placas de medio agar extracto de malta (MEA) durante 5 días. Seguidamente en el centro de la placa se colocó un taco de agar conteniendo micelio de los hongos fitopatógenos anteriormente mencionados a una distancia de 2 cm del borde de la colonia de la actinobacteria ensayada. Las placas se incubaron a continuación a 25°C durante 5-10 días para determinar el posible efecto inhibitorio de la cepa de actinobacterias frente a los hongos fitopatógenos. Un total de 1 actinobacteria endofítica (VV/E1) y 2 cepas rizosféricas (VV/R1 y VV/R4) se seleccionaron por su capacidad para inhibir *in vitro* de forma efectiva el crecimiento de ambos patógenos. La capacidad de inhibición

del crecimiento se determinó mediante la metodología de Lamsal y col. (2012) [Mycobiology 40: 244-251], calculando la Tasa de Inhibición (TI, %) de cada una de las actinobacterias empleando la siguiente expresión: $TI (\%) = [1 - (Da - D) / (Dc - D)] \times 100$; donde Da es el crecimiento del hongo en el ensayo de antagonismo, Dc es el diámetro de crecimiento en el control (no antagonismo con ninguna actinobacteria), y D es el diámetro del taco de agar que contenía el hongo (7 mm). Este experimento fue realizado por triplicado para cada una de las actinobacterias. En este ensayo la cepa VV/E1 mostró una inhibición del crecimiento frente a *D. seriata* del 56.8 (±6.1)% y del 38.8 (±2.9)% frente a *I. macrodidyma*. La cepa VV/R1 10 mostró respectivamente una inhibición del crecimiento del 48.8 (±3.9)% y del 53.7 (±4.2)% frente a *D. seriata* e *I. macrodidyma* respectivamente. La cepa VV/R4 fue capaz de inhibir *in vitro* el crecimiento de *D. seriata* en un porcentaje del 51.7 (±6.2) y el de *I. macrodidyma* en un 50.8% (±3.7).

Las 3 cepas preseleccionadas mostraron una alta capacidad también para inhibir *in vitro* el crecimiento de otros hongos fitopatógenos como *Cadophora luteo-olivacea*, *Eutypa lata*, *Ilyonectria* sp., *Phaeomoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum*

* Ejemplo 2. Producción de biomasa de las cepas VV/R1, VV/R4 y VV/E1.

Se utilizaron dos metodologías diferentes a fin de probar la versatilidad de cada cepa a la hora de producir biomasa.

- 5 2.1).- Producción de biomasa por crecimiento en matraces en condiciones aeróbicas.

Para ello se utilizaron matraces de 1L que contenían 0.2 L de medio caldo extracto de malta. Cada matraz se inóculo con 5 ml de un cultivo desarrollado en el mismo medio de D.O. 1 estimada espectrofotométricamente a 600 nm. Los matraces se
10 incubaron a 28°C con agitación constante de 220 r.p.m en un incubador orbital. El crecimiento se determinó cada 24 horas. Durante el proceso se comprobó la homogeneidad del cultivo mediante observación directa al microscopio óptico. Una vez finalizada la incubación la viabilidad celular se chequeó mediante recuento de
15 unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). Todas las cepas crecieron con gran rapidez en estas condiciones obteniéndose una gran cantidad de biomasa y una viabilidad igual o superior a la de la especie *S. coelicolor* empleada como

control.

2.2).- Producción de biomasa en fermentador.

5 El estudio se realizó en un fermentador de laboratorio Biostat-A de 2.5 L, controlando los distintos parámetros que afectan a las cepas tales como O₂ disuelto, pH, espuma, acidez y temperatura. Para el desarrollo de los cultivos se empleó 1.5 L de medio caldo extracto de malta que fue inoculado con un precultivo de cada bacteria hasta obtener una suspensión celular de D.O. = 0.1 (determinada a 600
10 nm). El pH del cultivo se mantuvo constante en un valor de 7.0 y la temperatura de incubación fue de 28°C. Finalmente la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo constante en el 35%. El crecimiento y la viabilidad celular se monitorizaron como se indica en el apartado anterior. En estas condiciones todas las cepas mostraron una producción de biomasa rápida y homogénea con una elevada
15 viabilidad celular, del mismo orden de magnitud que la cepa *S. coelicolor* usada como testigo.

* Ejemplo 3. Ensayos en campo: aplicación de las cepas *Streptomyces* sp. VV/R1, VV/R4 y VV/E1 a injertos de vid.

Las 3 cepas de actinobacterias preseleccionadas - actinobacteria endofítica (VV/E1) y 2 cepas rizosféricas (VV/R1 y VV/R4)- se crecieron en medio caldo extracto de malta mediante inoculación de 200 ml de medio en matraces de 1L de capacidad a 28°C y 220 rpm de agitación durante 120 horas.

La biomasa microbiana se precipitó por centrifugación a 12.000 xg durante 20 minutos a 4°C. Seguidamente se resuspendió en 50 ml de glicerol al 20% (p/v) y se conservó a -20°C hasta su aplicación.

Inmediatamente antes de su aplicación se procedió a una cuantificación del número de bacterias presentes en cada preparación por siembra de diluciones sucesivas en medio PDA e incubación a 28°C durante 5 días.

La aplicación de las bacterias a los injertos se realizó sobre lotes de 100 injertos

(portainjertos R-110 y variedad tempranillo blanco) por inmersión de la porción basal del portainjertos en 2L de solución conteniendo hormona de enraizamiento a la que se añadieron 10^7 células bacterianas por ml en forma de una suspensión en glicerol al 20% (p/v). En paralelo se realizó un control negativo de injertos a los que se
5 añadió una cantidad equivalente de glicerol al 20% sin bacterias.

Los injertos se mantienen en solución de enraizamiento con bacterias durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se plantan en campo para el establecimiento de un vivero experimental, que es mantenido en condiciones óptimas por personal
10 especializado de Viveros Villanueva Vides S.L. mediante el aporte del programa de fertirrigación normal que aplica la empresa.

Setenta días después de su establecimiento en suelo se realizó un control de los injertos consistente en: determinación de nivel de mortalidad (injertos no brotados
15 frente a injertos totales puestos en campo), altura total de la planta y longitud de séptimo entrenudo.

- Las plantas se arrancaron 200 días después de su establecimiento en campo y se procedió a determinar el nivel de infección por los hongos patógenos *Ilyonectria* sp, *P. chlamydospora* y *P. aleophilum* en el punto de inserción de raíz, a fin de determinar el posible efecto protector de las actinobacterias aplicadas para evitar la
- 5 infección de estos hongos a través del aparato radicular. El análisis se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Giménez-Jaime y colaboradores [Giménez-Jaime et al., 2006, J. Phytopathol. 154: 598– 602] y Aroca y colaboradores [Aroca et al., 2006, Eur. J. Plant Pathol. 115: 195-202].
- 10 La identificación de los hongos aislados se realizó como se indica a continuación:
- Para identificar las especies de la familia Botryosphaeriaceae se siguieron los criterios morfológicos clásicos [Phillips et al., 2013, Studies in Mycology 76:51– 167] y las técnicas moleculares descritas para este grupo [Alves et al., 2007, Res.
- 15 Microbiol. 158:112– 21; Martos et al., 2009, Phytopathol. Mediterr. 48:162; Spagnolo et al. 2011, Europ. J. Plant Pathol. 129: 485– 500].

- Las diferentes especies del género *Phaeoacremonium* se identificaron siguiendo la clave electrónica de identificación desarrollada por Mostert y colaboradores [Mostert et al. 2006, *Studies in Mycology* 54:1– 113] Adicionalmente se utilizaron oligonucleótidos específicos para detectar *P. aleophilum* [Tegli et al., 2000, 5 *Phytopathol. Mediterr.* 39:134– 49].
- La identificación de especies de *Ilyonectria* se llevó cabo teniendo en cuenta la reciente reclasificación de algunas especies del género “ *Cylindrocarpon*” [Cabral et al., 2012, *Fungal biology* 116:62– 80.] asociadas a enfermedades de la madera. 10
- La identificación de *Phaeomoniella chlamydospora* se desarrolló de acuerdo con los criterios morfológicos descritos clásicos [Crous y Gams, 2006, *Phytopathol. Mediterr.* 39: 112– 18] y la detección específica por PCR [Tegli et al., 2000, *Phytopathol. Mediterr.* 39:134– 49].
- 15 Los ensayos en campo se realizaron durante 2 años consecutivos en 3 lotes de 25 plantas por tratamiento y año.

Los ensayos en campo pusieron de manifiesto que:

- A).- Los injertos control establecidos en vivero en campo mostraron un nivel medio de mortalidad del 31.7%. La aplicación de las actinobacterias a los injertos produjo un descenso de la mortalidad al 26.3% -cepa VV/E1- (descenso en mortalidad respecto al control del 17.0%); un descenso en la mortalidad al 19.3% -cepa VV/R1- (descenso en mortalidad respecto al control del 39.1%) y un descenso en la mortalidad al 21.0% -cepa VV/R4- (descenso en mortalidad respecto al control del 33.8%), como podemos apreciar en la **Figura 2**.
- 10 B).- El grado de infección de los injertos establecidos en vivero en campo disminuyó de forma significativa tras la aplicación de las actinobacterias seleccionadas (**Figura 3**). En efecto, asignando un valor relativo de 100 para el nivel de infección por los hongos patógenos *Ilyonectria* sp., *P. chlamydospora* y *P. aleophilum* en plantas control injertadas (no tratadas con actinobacterias) y establecidas en vivero en
- 15 campo al acabar la temporada de cultivo observamos como el nivel de infección disminuyó al 26.9% (descenso del 73.1%) en el caso de plantas tratadas con las cepas VV/R1 y VV/R4, mientras que el nivel de infección disminuyó al 23.1%

(descenso del 76.9%) en el caso de plantas tratadas con la actinobacteria VV/E1.

REIVINDICACIONES

1^a.- Producto para el control de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades de
madera de vid y su aplicación en injertos de vid, caracterizado porque se materializa
5 en la cepa del género *Streptomyces* sp. y depositadas en la CECT con el número de
acceso CECT 8852 (cepa *Streptomyces* sp. VV/E1).

2^a.- Producto para el control de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades de
madera de vid y su aplicación en injertos de vid, caracterizado porque se materializa
10 en la cepa del género *Streptomyces* sp. y depositadas en la CECT con el número de
acceso CECT 8853 (cepa *Streptomyces* sp. VV/R1)

3^a.- Producto para el control de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades de
madera de vid y su aplicación en injertos de vid, caracterizado porque se materializa
15 en la cepa del género *Streptomyces* sp. y depositadas en la CECT con el número de
acceso CECT 8854 (cepa *Streptomyces* sp. VV/R4).

4^a.- Procedimiento para el control de hongos fitopatógenos causantes de

enfermedades de madera de vid, de acuerdo con los productos de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque consiste en la aplicación de forma individual, o en cualquier combinación de dichos productos, a injertos de vid durante la fase de tratamiento con hormona de enraizamiento (o cualquier otra fase previa al establecimiento del vivero de injertos en tierra) para la obtención de plantas de vid con un menor grado de infección por hongos causantes de enfermedades de madera de vid.

5^a.- Procedimiento para el control de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades de madera de vid, de acuerdo con los productos de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque consiste en la aplicación de forma individual o en cualquier combinación de dichos productos a injertos de vid, durante la fase de tratamiento con hormona de enraizamiento (o cualquier otra fase previa al establecimiento del vivero de injertos en tierra) para conseguir una reducción en el nivel de mortalidad de injertos establecidos en vivero.

6^a.- Procedimiento para el control de hongos fitopatógenos causantes de

enfermedades de madera de vid, de acuerdo con los productos de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque consiste en la aplicación de forma individual o en cualquier combinación de dichos productos al aparato radicular de plantas jóvenes y adultas en campo mediante fertirrigación o cualquier otra técnica alternativa para el

5 control de hongos causantes de enfermedades de madera de vid.

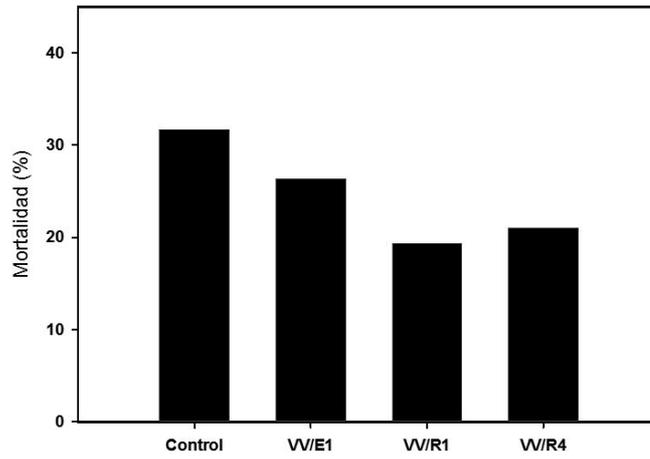


FIG. 1

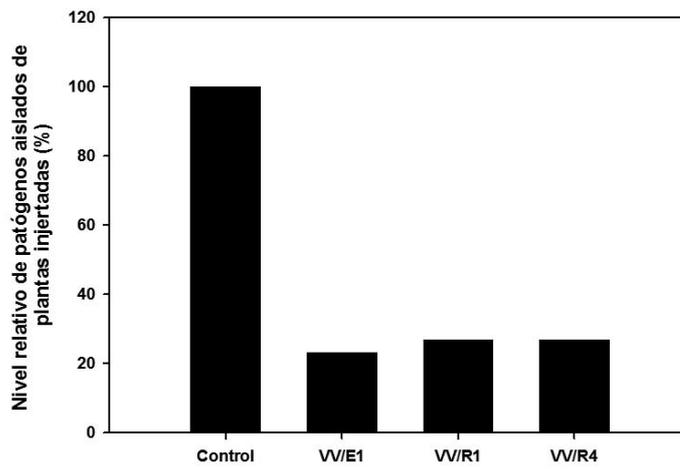


FIG. 2



②¹ N.º solicitud: 201530448

②² Fecha de presentación de la solicitud: 01.04.2015

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ZIEDAN EL-SAYED H. <i>et al.</i> <i>Streptomyces</i> alni as a biocontrol agent to root-rot of grapevine and increasing their efficiency by biofertilisers inocula. Archives of Phytopathology and Plant Protection. Mayo 2010 VOL: 43 No: 7 Págs: 634-646 ISSN 0323-5408 (Impreso) ISSN 1477-2906(Electrónico) Doi: doi:10.1080/03235400802021264. Ver todo el documento.	1-6
A	WO 2010115802 A1 (UNIV REIMS CHAMPAGNE ARDENNE et al.) 14.10.2010, todo el documento, especialmente los ejemplos 1-4,6.	1-6
A	LOQMAN S. <i>et al.</i> Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Enero 2009 Kluwer Academic Publishers VOL: 25 No: 1 Págs: 81-91 ISSN 0959-3993 (Impreso) Doi: doi:10.1007/s11274-008-9864-6. Ver todo el documento.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
05.08.2015

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N63/02 (2006.01)

A01P3/00 (2006.01)

A01G17/02 (2006.01)

A01P3/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N, A01P, A01G

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPIAP, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.08.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ZIEDAN EL-SAYED H. <i>et al.</i> Archives of Phytopathology and Plant Protection Mayo 2010 VOL: 43 No: 7 Págs: 634-646. ISSN 0323-5408 (Impreso) ISSN 1477-2906 (Electrónico) Doi: doi:10.1080/03235400802021264.	Mayo 2010
D02	WO 2010115802 A1 (UNIV REIMS CHAMPAGNE ARDENNE <i>et al.</i>)	14.10.2010
D03	LOQMAN S. <i>et al.</i> World Journal of Microbiology and Biotechnology. Enero 2009. Kluwer Academic Publishers VOL: 25 No: 1 Págs: 81-91. ISSN 0959-3993 (Impreso) Doi: doi:10.1007/s11274-008-9864-6.	Enero 2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica un producto para el control de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades de madera de vid, aplicable en injertos de estas plantas, y que consiste en bacterias del género *Streptomyces* sp. depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo con los números de depósito CECT 8852, CECT 8853 y CECT 8854. Los microorganismos se aíslan de la rizosfera o de las raíces de la planta. Se reivindica también un procedimiento para control de esos hongos fitopatógenos en vid, que se basa en la aplicación de los productos anteriores al aparato radicular de injertos de vid en fases previas al establecimiento de los injertos en tierra, y con el que se consiguen plantas de vid con un menor grado de infección por hongos y/o una reducción en el nivel de mortalidad de los injertos en el vivero.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue los productos y el procedimiento objeto de la solicitud tal y como están reivindicados, ni se han encontrado documentos que, solos o en combinación con otros, pudieran conducir al experto en la materia a los productos y al procedimiento de la invención, por lo que las reivindicaciones 1 a 6 de la solicitud tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes, respectivamente.

Se citan en este informe tres documentos del campo técnico de la solicitud que se consideran cercanos a la misma, pero que no afectan su novedad ni su actividad inventiva.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se describe la capacidad antifúngica de cepas de *Streptomyces* aisladas de rizosfera de suelos de viñedos. La cepa más activa se caracteriza como *Streptomyces alni*, y se prueba la actividad de esta cepa bacteriana (sola o combinada con distintos biofertilizadores) frente a hongos patógenos de vid, tanto en experimentos *in vitro* como en plantones cultivados en invernadero (tabla 4) y en campo (tabla 5). Del mismo modo que en la presente solicitud, en este artículo se demuestra que si se cultivan plantones de vid en suelos infectados con el patógeno (*Fusarium oxysporium*, causante del pie-negro en viñedos) y se tratan los suelos empapándolos con una suspensión de esporas de *S. alni* (con o sin biofertilizadores), se reduce la infección fúngica y se aumenta la producción de las plantas. No se considera que el documento D01 afecte la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud, ya que se trata de patógenos distintos, que causan enfermedades diferentes en la vid, y de diferentes especies de *Streptomyces*, por lo que la información divulgada en D01 no conduciría al experto en la materia a los productos y al procedimiento de la invención.

En los documentos D02 y D03 también se divulga la utilidad de cepas de *Streptomyces* aisladas de rizosfera de viñedos como agentes de biocontrol de enfermedades causadas por hongos patógenos de vid. Igual que en el caso anterior, se trata de hongos diferentes a los de la solicitud, que originan enfermedades distintas a las de madera de vid, y que se tratan con cepas diferentes de *Streptomyces*. Por tanto, tampoco los documentos D02 y D03 afectan la novedad ni la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 6 de la solicitud, según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes, respectivamente.