

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 306**

51 Int. Cl.:

**A01N 63/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2009 PCT/US2009/050706**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010 WO2010009241**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2009 E 09790472 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2320742**

54 Título: **Control de enfermedades de plantas empleando una combinación de una especie de Trichoderma virens y una especie de Trichoderma harzianum competente en la rizosfera**

30 Prioridad:

**17.07.2008 US 81497 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.05.2017**

73 Titular/es:

**BIOWORKS, INC. (100.0%)  
100 Rawson Road Suite 205  
Victor, NY 14564, US**

72 Inventor/es:

**MARTIN, WILLIAM, RANDOLPH, JR. y  
HAYES, CHRISTOPHER, KENT**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 613 306 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

Control de enfermedades de plantas empleando una combinación de una especie de *Trichoderma virens* y una especie de *Trichoderma harzianum* competente en la rizosfera

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EEUU n.º de serie 61/081.497, presentada el 17 de julio, 2008.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al control de enfermedades de plantas y la potenciación del crecimiento vegetal empleando una combinación de una especie de *Trichoderma harzianum* T22 competente en la rizosfera y una especie de *Trichoderma virens* G41.

10 **Antecedentes de la invención**

*Phytophthora* spp. son agentes patógenos de la familia *Pythiaceae* que se sabe que están implicados en diversas enfermedades de plantas. La muerte súbita del roble, la podredumbre radicular de la soja, la podredumbre del pie y el cuello del manzano, la podredumbre radicular que afecta al castaño americano, al rododendro, a la violeta africana o a las fresas son solo ejemplos de enfermedades provocadas por este grupo de patógenos. Generalmente, las enfermedades de plantas provocadas por *Phytophthora* son considerablemente difíciles de controlar y a menudo conducen a la muerte de la planta. Este patógeno está ampliamente difundido y es un problema económico para los cultivadores en todo el mundo. Por ejemplo, *Phytophthora infestans* fue el agente infeccioso de la patata que provocó la Gran Hambruna en Irlanda entre 1845 y 1849. En la actualidad, en América del Norte los cultivadores aún se están enfrentando a los estragos de este agente patógeno. Muchas de las técnicas de gestión convencionales, tales como la selección de pies de injerto y la modificación del sitio para controlar a *Phytophthora* spp. han resultado, en su mayor parte, poco fiables.

La podredumbre del pie y el cuello, provocada por al menos cuatro *Phytophthora* spp. (Jeffers *et al.*, *Phytopathology*, 2:533-538 (1982)) es un problema en manzanos ampliamente difundido y muy grave desde el punto de vista económico en el noreste de EEUU. En el estado de Nueva York, esta enfermedad parece ser la causa biológica más común de deterioro y muerte prematuros de árboles y, en Pensilvania, muchos cultivadores han abandonado el pie de injerto MM 106, deseable desde el punto de vista hortícola, debido a la alta incidencia de podredumbre del pie o la impresión que causa su amenaza. La podredumbre radicular y del tallo de la soja provocada por *Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann (también denominada *Phytophthora megasperma* forma *specialis glycinea*) también es un problema ampliamente difundido y muy grave. Debido a que ninguna estrategia individual para controlar la podredumbre del pie de *Phytophthora* ha demostrado ser fiable, se ha aconsejado a los cultivadores que adopten una estrategia de gestión de la enfermedad integrada o aditiva, que utiliza una combinación de selección del sitio, modificación del sitio, selección de pies de injerto y tratamientos químicos cuando resulte apropiado.

*Pythium*, al igual que otros en la familia *Pythiaceae*, se caracteriza habitualmente por su producción de hifas cenocíticas, hifas sin septos. Se denominan habitualmente moho de agua. La enfermedad del vivero por *Pythium* es un problema muy habitual en campos e invernaderos, en donde el organismo mata a las plántulas recién emergidas. Esta compleja enfermedad normalmente implica a otros patógenos, tales como *Phytophthora* y *Rhizoctonia*. La marchitez por *Pythium* es provocada por la infección por zoosporas de plantas más maduras, que conduce a infecciones biotróficas que se convierten en necrotroficas en respuesta a las presiones de colonización/reinfección o al estrés ambiental, que conducen a una marchitez leve o grave provocada por la obstaculización del funcionamiento de las raíces. Véase Jarvis, W.R., "Managing Diseases in Greenhouse Crops," APS Press, St. Paul, Minn. (1992); Bagnall, R., "Control of Pythium Wilt and Root Rot of Hydroponically Grown Lettuce by Means of Chemical Treatment of the Nutrient Solution," tesis doctoral, University of Pretoria, Pretoria, Sudáfrica (2007); Plaats-Niterink A.J. van der, "Monograph of the Genus Pythium," *Studies in Mycology*, 21:1-242 (1981); Levesque *et al.*, "Molecular Phylogeny and Taxonomy of the Genus Pythium," *Mycological Research*, 108:1363-1383 (2004); Jarvis, W.R., "Managing Diseases in Greenhouse Crops," APS Press, St. Paul, Minn. (1992); Owen-Going, T.N., "Etiology and Epidemiology of *Pythium* Root Rot in Bell Pepper (*Capsicum annuum* L.) en Commercial-Scale and Small-Scale Hydroponic Systems," tesis doctoral, University of Guelph, Guelph, Ontario (2002); Owen-Going *et al.*, "Relationships of *Pythium* Isolates and Sweet Pepper Plants in Single-Plant Hydroponic Units," *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25:155-167 (2003); Owen-Going, T.N., "Quantitative Investigations of Phenolic Compounds Associated With Root Rot of Hydroponic Pepper (*Capsicum annuum* L. Caused by *Pythium aphanidermatum*, (Edson) Fitzp., tesis doctoral University of Guelph, Guelph, Ontario (2005).

Muchas especies de *Pythium*, junto con sus parientes cercanos, las especies de *Phytophthora*, son patógenos vegetales de importancia económica en la agricultura. *Pythium* spp. tienden a ser muy generalistas e inespecíficos en su gama de hospedantes. Infechan a una amplia gama de hospedantes, mientras que *Phytophthora* spp. en general son más específicos de hospedante. Por esta razón, *Pythium* spp. son más devastadores en la podredumbre de la raíz que provocan en los cultivos, porque solo la rotación de cultivos a menudo no erradica al patógeno (ni tampoco dejar en barbecho el terreno, puesto que *Pythium* spp. también son buenos saprofitos y sobreviven durante mucho tiempo alimentándose de la materia vegetal en descomposición).

*Fusarium* es un enorme género de hongos filamentosos ampliamente distribuido en el suelo y en asociación con plantas. La mayoría de las especies son saprofitos inofensivos y son miembros relativamente abundantes de la comunidad microbiana del suelo. Algunas especies producen micotoxinas en cultivos de cereales que pueden afectar a la salud humana y animal si entran en la cadena alimentaria. Las principales toxinas producidas por estas especies de *Fusarium* son las fumonisinas y los tricotecenos. El género incluye una serie de especies de patógenos vegetales importantes desde el punto de vista económico. Véase Priest y Campbell, "Brewing Microbiology," 3ª edición, ISBN 0-306-47288-0; Walsh *et al.*, "Spectrum of Mycoses," en: Baron's Medical Microbiology (Baron S *et al.*, eds.), 4ª ed., Univ of Texas Medical Branch. (a través de NCBI Bookshelf), ISBN 0-9631172-1-1 (1996); Howard, D.H., "Pathogenic Fungi in Humans and Animals," 2ª ed., Marcel Dekker. (a través de Google Books), ISBN 0-8247-0683-8 (2003); Van der Walta *et al.*, "*Fusarium* Populations in the Household Food Gardens of a Peri-Urban Community," South African Journal of Science, 103 (2007); World Health Organization (1999-09-01), "Toxic Effects of Mycotoxins in Humans" (2007); Drug Policy Alliance, "Repeating Mistakes of the Past: Another Mycoherbicide Research Bill," (2006); Yellow rain: Thai bees' Faeces Found. Nature, PMID 6709055 (1984); Imamura *et al.*, "*Fusarium* and *Candida albicans* Biofilms on Soft Contact Lenses: Model Development, Influence of Lens Type, and Susceptibility to Lens Care Solutions," Antimicrob. Agents Chemother., 52(1):171-182 (2008).

*Fusarium graminearum* habitualmente infecta a la cebada si se producen lluvias tardías en la temporada. Tiene un impacto económico en las industrias de la malta y cervecera, así como en la cebada para piensos. La contaminación por *Fusarium* en la cebada puede producir fusariosis y, en contaminaciones extremas, la cebada puede tomar un color rosado. Se ha secuenciado el genoma de este patógeno del trigo y del maíz. *Fusarium graminearum* también puede provocar la podredumbre radicular y la fusariosis de la plántula. Se ha calculado que las pérdidas totales en EEUU de cultivos de cebada y trigo entre 1991 y 1996 han sido de tres mil millones de dólares.

*Rhizoctonia* spp. se encuentran entre los patógenos vegetales más diversos y provocan enfermedades radiculares, del tallo y foliares de muchas de nuestras plantas herbáceas y ornamentales leñosas más importantes. *Rhizoctonia* spp. habitualmente atacan a las plantas en la línea del suelo y provocan la pérdida de la raíz y la constricción del tallo que produce estrangulamiento y muerte en las partes altas. Este patógeno puede atacar también a las hojas y es especialmente grave cuando las plantas se cultivan muy juntas y se mantienen húmedas. Pueden perderse parcelas o lechos de cepas completos debido a *Rhizoctonia* en periodos muy cortos de tiempo. El patógeno es transmitido por el suelo, lo cual significa que vive en el suelo o en un medio para macetas. Provoca la enfermedad del vivero pre- y postemergencia de muchos cultivos ornamentales, tales como *Vinca*, *Impatiens*, cepas, y antirrino (Chase, A. R., "Rhizoctonia Diseases on Ornamentals," Western Connection, Turf and Ornamentals (1998)).

*Thielaviopsis basicola* (Berk. & Br.) Ferraris es un habitante del suelo que ataca a más de 100 especies vegetales en 33 familias. Los miembros de las familias *Fabaceae*, *Solanaceae*, y *Cucurbitaceae* se ven especialmente afectados por *T. basicola* (Shew *et al.*, eds., "Compendium of Tobacco Diseases," St. Paul, MN: APS Press, pp. 28-29 (1991)). Su nombre común, 'podredumbre negra radicular', se basa en las clamidosporas de pigmentación muy oscura que se forman en las células radiculares del hospedante y que confieren un aspecto 'ennegrecido' al ápice radicular (Alexopoulos *et al.*, "Introductory Mycology," 4ª Ed., pp. 869 (1996)). El hongo de la podredumbre negra radicular es un miembro de los *Hyphomycetes*, orden *Moniliales*, familia *Dematiaceae* (Shew *et al.*, eds., "Compendium of Tobacco Diseases," St. Paul, MN: APS Press, pp. 28-29 (1991)). Los síntomas generales son la podredumbre de las raíces y la muerte regresiva de las ramas. *Thielaviopsis basicola* puede encontrarse en todas las regiones del mundo, en especial en regiones de clima fresco. La podredumbre negra radicular puede afectar a una amplia gama de plantas leñosas y herbáceas, que incluyen el tabaco, acebo, begonia, geranio, poinsettia, y pensamiento (Agrios, G.N., "Plant Pathology," 4ª ed., p. 358 (1997); Alexopoulos *et al.*, "Introductory Mycology," 4ª ed., pp. 869 (1996); Daughtrey *et al.*, "Compendium of Flowering Potted Plants," pp. 90 (1995); Lambe *et al.*, "Diseases of Woody Ornamental Plants and Their Control in Nurseries," pp. 130 (1986); Shew *et al.*, eds., "Compendium of Tobacco Diseases," pp. 28-29 (1991)).

*Sclerotium rolfsii*, un patógeno fúngico omnívoro transmitido por el suelo, provoca enfermedades en una amplia gama de cultivos agrícolas y hortícolas. Aunque no se ha publicado una compilación a nivel mundial de géneros de hospedantes, se han indicado más de 270 géneros hospedantes solo en EEUU. Los hospedantes agrícolas susceptibles incluyen la batata (*Ipomea batatas*), calabaza (*Cucurbita pepo* L.), maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum vulgare*) y cacahuete (*Arachis hypogaea*). Los cultivos hortícolas afectados por el hongo se incluyen en los géneros *Narcissus*, *Iris*, *Lilium*, *Zinnia*, y *Chrysanthemum*. Véase Aycocock, R., "Stem Rot and Other Diseases Caused by *Sclerotium rolfsii*," N.C. Agr. Expt. St. Tech. Bul., n° 174 (1966); Garren, K.H., "The Stem Rot of Peanuts and its Control," Virginia Agr. Exp. Sta. Bull., 144 (1959); Paolo, M.A., "A *Sclerotium* Seed Rot and Seedling Stem Rot of Mango," Philippine Journal of Science, 52:237-261 (1933); Punja, Z.K., "The Biology, Ecology, and Control of *Sclerotium rolfsii*," Annual Review of Phytopathology, 23:97-127 (1985); Takahashi, T., "A *Sclerotium* Disease of Larkspur," Phytopathology, 17:239-245 (1927); Townsend *et al.*, "The Development of Sclerotia of Certain Fungi," Ann. Bot., 21:153-166 (1954); Weber, G.F., "Blight of Carrots Caused by *Sclerotium rolfsii*, With Geographic Distribution and Host Range of the Fungus," Phytopathology, 21:1129-1140 (1931); Zitter *et al.*, "Compendium of Cucurbit Diseases," Amer. Phytopath. Soc., St. Paul, Minnesota (1966).

Aunque se cree que *S. rolfsii* ha provocado importantes pérdidas en cultivos a lo largo de muchos siglos, el primer informe inconfundible del hongo se remonta a 1892 con el descubrimiento del organismo realizado por Peter Henry Rolfs en asociación con la fusariosis del tomate en Florida. Desde el informe de Rolfs a finales del siglo XIX, más de

2.000 publicaciones sobre el patógeno apoyan las pruebas de su distribución mundial, en particular en regiones tropicales y subtropicales.

La amplia gama de hospedantes, el crecimiento prolífico y la capacidad para producir esclerocio contribuyen a las pérdidas económicas más grandes asociadas con el patógeno. Desde una perspectiva global, y desde la perspectiva local de Carolina del Norte, los cultivos de cacahuete soportan las mayores pérdidas frente a cualquier otro cultivo agrícola. En 1959, el Departamento de Agricultura de EEUU ha calculado unas pérdidas desde diez millones a veinte millones de dólares asociadas con *S. rolfisii* en la región meridional cultivadora de cacahuetses, con unas mermas en el rendimiento que varían de 1-60% en terrenos en la región de los llanos costeros de Carolina del Norte.

Existen pruebas correlativas de que ciertos *Trichoderma* spp. pueden estar implicados en el control biológico de varias enfermedades provocadas por *Phytophthora* spp., por ejemplo, *T. viride* frente a la podredumbre del corazón de la piña provocada por *P. parasitica* (Papavizas, Ann. Rev. Phytopathol., 23:23-54 (1985)). Unas pruebas correlativas más convincentes son suministradas por la capacidad bien documentada de la corteza de maderas duras compostada (CHB) para proporcionar un control de la enfermedad de *Phytophthora* en plantas leñosas cuando se incorporan en su rizosfera (Hoitink *et al.*, Ann. Rev. Phytopathol., 24:93-114 (1986)), que incluye el control de la podredumbre del pie del manzano bajo condiciones de campo (Ellis *et al.*, Plant Dis., 70:24-26 (1986)), y la documentación relacionada, ya que la adición de CHB a un recipiente de mezcla para macetas produjo un aumento de 100 a 100.000 veces en los niveles poblacionales de *T. harzianum* en este medio de enraizado (Nelson *et al.*, Phytopathology, 3:1457-1462 (1983)).

El control biológico (biocontrol) de patógenos vegetales se está convirtiendo en un componente fundamental para la gestión de enfermedades de plantas. La dependencia excesiva de plaguicidas químicos, los sistemas agrícolas no sostenibles, la mala selección del sitio y los recursos limitados son ejemplos de los problemas agrícolas a los que se enfrentan los cultivadores. El biocontrol ofrece una alternativa a estos problemas recurrentes/persistentes en la agricultura. Por tanto, se está poniendo mucho énfasis en la aplicación de estas técnicas en la agricultura.

Se sabe que muchos hongos y otros microorganismos controlan diversos patógenos vegetales. Estos agentes de biocontrol son particularmente atractivos, porque pueden ser capaces de proteger y colonizar porciones de la planta que son particularmente inaccesibles a los tratamientos agrícolas convencionales (Harman *et al.*, Seed Sci. and Technol., 11:893-906 (1983)). *Trichoderma* spp, un género de hongo filamentosos, ha demostrado proporcionar niveles variables de control biológico frente a patógenos vegetales transmitidos por el suelo. Se sabe que cinco especies de *Trichoderma* son las más importantes para el biocontrol. Son *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. konigii*, *T. polysporum*, y *T. viride*. Se atribuyen rasgos deseables y fundamentales para la capacidad de biocontrol a cepas específicas y no a la especie. Por ejemplo, se han implicado a cepas de *T. harzianum* en el tratamiento del pepino. Aunque se han producido muchos avances en el uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol, no fue hasta 1992 que este hongo se indicó en el tratamiento de enfermedades provocadas por *Phytophthora* spp. transmitido por el suelo (Papavizas, Ann. Rev. Phytopathol., 23:23-54 (1985)). Se han empleado tres cepas de *Gliocladium virens* (031, 035, y 041), ahora denominado *Trichoderma virens*, como agentes biológicos (patente de EEUU n.º 5.165.928 de Smith *et al.*) para controlar enfermedades de plantas suscitadas por *Phytophthora* spp, tales como la podredumbre radicular y la podredumbre del pie y el cuello (Jeffers *et al.*, Phytopathology, 2:533-538 (1982)). Sin embargo, esta invención se limita al tratamiento de enfermedades de plantas provocadas por *Phytophthora sojae*. Además, existe la cepa GL-21, que se describe en la patente de EEUU 5.068.105 de Lewis *et al.* y comercializada como SoilGard™.

Se han empleado combinaciones de diferentes agentes de biocontrol para controlar enfermedades. Por ejemplo, Lewis *et al.*, "A Formulation of *Trichoderma* and *Gliocladium* to Reduce Damping-off Caused by *Rhizoctonia solani* and Saprophytic Growth of the Pathogen in Soiless Mix," Plant Disease, 82:501-06 (1998) emplean una formulación de *Gliocladium virens* TRI-4 y *Trichoderma hamatum* GL-3, GL-21, o GL-32 para el biocontrol. Una formulación con una base de talco denominada NUTRI-LIFE TRICHOSHIELD™ ha sido comercializada por Nutri-Tech Solutions Pty Ltd. como estimulante del crecimiento radicular en plantas. Esta formulación contiene una mezcla de especies fúngicas beneficiosas, que incluyen *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum*, y *Gliocladium virens* (ahora *Trichoderma virens*), junto con *Bacillus subtilis*, que proporciona bioequilibrio. Papavizas, *et al.*, "Effect of *Gliocladium* and *Trichoderma* on Damping-off and Blight of Snapbean Caused by *Sclerotium rolfisii* in the Greenhouse," Plant Pathology, 38: 277-86 (1989) describen el uso de 285 cepas de tipo salvaje y mutantes de *Gliocladium virens*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzianum*, y *Trichoderma viride* contra *Scelerothium rolfisii* en invernaderos. Diez cepas de *Gliocladium virens* y cuatro cepas de *Trichoderma harzianum* suprimieron la enfermedad del vivero de la judía verde en 30-50% y la fusariosis en 36-74%. Las cepas individuales fueron tan o más eficaces que las mezclas de cepas. Por ejemplo, la mezcla de GI-3 y Th-84 a  $3 \times 10^5$  conidios por g de suelo para cada cepa fue menos eficaz que GI-3 o Th-84 empleadas por sí solas, y la mezcla triple fue la menos eficaz. Estos resultados sugieren a los expertos en la técnica que *Trichoderma harzianum* y *Gliocladium virens* deben utilizarse por separado para tratar plantas, en lugar de hacerlo en combinación. En cualquier caso, ninguna de las combinaciones descritas anteriormente de agentes de biocontrol implica la utilización de una especie de *Trichoderma harzianum* competente en la rizosfera.

La presente invención se dirige a solucionar estas y otras deficiencias en la técnica.

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método para controlar enfermedades de plantas mediadas por especies de *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, y/o *Thielaviopsis*. El método incluye proporcionar una especie de *Trichoderma harzianum* T22 competente en la rizosfera y proporcionar una especie de *Trichoderma virens* G41. La especie de *Trichoderma harzianum* y la especie de *T. virens* se aplican a las plantas bajo condiciones eficaces para tratar enfermedades de plantas mediadas por especies de *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, y/o *Thielaviopsis*.

Debido a los múltiples defectos observados con agentes de biocontrol individuales o específicos, es muy necesario un agente variado capaz de tratar diversas *Phytophthora* spp. Esto no solo aumentará la productividad de las plantas diana, sino que también disminuirá potencialmente el coste de tener que comprar múltiples agentes de biocontrol.

La combinación de *T. harzianum* T22 competente en la rizosfera y *T. virens* G41 evita que las plantas enfermen y tiene una mejor actuación que cualquiera de los organismos por sí solos; se produce un efecto potenciado en la protección frente a enfermedades cuando los dos son combinados. Además, la combinación tiene una actuación tan buena como los fungicidas químicos. En particular, las plantas tratadas con esta combinación no mostraron síntomas o mostraron síntomas menos graves de infección por patógenos y tienen una mayor masa radicular, crecen más altas, y son más comercializables que las plantas tratadas con cualquiera de los agentes biológicos por sí solos. Las plantas enfermas generalmente muestran múltiples síntomas, en general asociados con la falta de crecimiento radicular y, en último término, la muerte de las raíces.

Los cultivadores y los consumidores están interesados en reducir el uso de plaguicidas químicos en cultivos agrícolas y buscan materiales alternativos para la gestión de plagas. Pueden emplearse materiales de control biológico eficaces que tengan un bajo impacto sobre el entorno y organismos no diana como alternativas a los plaguicidas químicos tradicionales o en un programa junto con los plaguicidas químicos tradicionales. La presente invención proporciona un control de amplio espectro de múltiples enfermedades en cultivos agronómicos y es una alternativa segura a los plaguicidas químicos.

## Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica de la población de T22 frente a G41 en la rizosfera del maíz.

## Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para controlar enfermedades de plantas mediadas por especies de *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* y/o *Thielaviopsis*. El método incluye proporcionar una especie de *Trichoderma harzianum* T22 competente en la rizosfera (ATCC n.º de registro 20847) y proporcionar una especie de *Trichoderma virens* G41, anteriormente conocida como *Gliocladium virens* (ATCC n.º de registro 20906). La especie de *Trichoderma harzianum* y la especie de *T. virens* se aplican a las plantas bajo condiciones eficaces para tratar enfermedades de plantas mediadas por especies de *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, y/o *Thielaviopsis*.

T22 se analiza a fondo en la patente de EEUU n.º 5.260.213 de Harman *et al.* G41 se analiza a fondo en la patente de EEUU n.º 5.165.928 de Smith *et al.*

La rizosfera es la estrecha región de suelo que se ve directamente influida por las secreciones radiculares y los microorganismos del suelo asociados. Está plagada de bacterias que se alimentan de células vegetales desprendidas, denominadas rizodepósito, y de las proteínas y azúcares liberados por las raíces. Los protozoos y los nemátodos que se alimentan de las bacterias también se concentran cerca de las raíces. Así, gran parte del ciclo de los nutrientes y de la represión de enfermedades, necesarios para la planta, se produce en el lugar inmediatamente adyacente a las raíces. El rizoplano es la superficie externa de las raíces y de las partículas de suelo y los desechos adheridos a ellas. La "competencia en la rizosfera" es una medida de la capacidad de un microorganismo para colonizar la rizosfera.

Los organismos competentes en la rizosfera tienen la capacidad fisiológica y genética de proliferar a lo largo de la raíz a medida que esta se desarrolla. Esta capacidad es distintivamente diferente de los organismos capaces de colonizar solo puntos específicos a lo largo de la raíz (Harman, J. Plant Nutr., 15:835-843 (1992)). *Trichoderma* spp. son uno de los pocos agentes de biocontrol en los que se ha demostrado competencia en la rizosfera. De hecho, la mayoría de las cepas de *Trichoderma* no son competentes en la rizosfera (Bailey *et al.*, *Trichoderma* and *Gliocladium*, pp. 185-204 (1998)). Una característica importante de *T. harzianum* cepa T22 es su competencia en la rizosfera (Sivan *et al.*, "Improved Rhizosphere Competence in a Protoplast Fusion Progeny of *Trichoderma harzianum*," J. Gen. Microbiol., 137:23-29 (1991)).

La presente invención puede incluir un vehículo. Los vehículos adecuados incluyen agua, disolución acuosa, suspensiones, gránulos o polvos.

Otros aditivos adecuados para su inclusión en las composiciones son fertilizantes, insecticidas, fungicidas,

nematicidas o sus mezclas.

5 Las enfermedades de plantas mediadas por especies de *Phytophthora* que pueden ser tratadas según la presente invención pueden surgir de una infección por *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora citricola*, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora drechsleri*, *Phytophthora infestans* y/o *Phytophthora nicotianae*.

Las enfermedades de plantas mediadas por especies de *Pythium* pueden surgir de una infección por *Pythium aphanidermatum*, *Pythium irregulare*, y/o *Pythium ultimum*.

Las enfermedades de plantas mediadas por especies de *Rhizoctonia* pueden surgir de una infección por *Rhizoctonia solani*.

10 Las enfermedades de plantas mediadas por especies de *Thielaviopsis* pueden surgir de una infección por *Thielaviopsis basicola*.

Las enfermedades de plantas mediadas por especies de *Fusarium* pueden surgir de una infección por especies de *Fusarium oxysporum* y subespecies relacionadas.

Las enfermedades de plantas que surgen de especies de *Sclerotium* pueden ser mediadas por *Sclerotium rolfsii*.

15 Las plantas tratadas según la presente invención incluyen cultivos en hilera agronómicos u otros cultivos de campo: trigo sarraceno, judías (soja, verdes, secas), maíz (grano, semilla, maíz dulce, de ensilaje, para palomitas de maíz, con alto contenido en aceite), algodón, canola, guisantes (secos, suculentos), cacahuets, cártamo, girasol, heno de alfalfa, cultivos forrajeros (alfalfa, trébol, arvejas y trifoliadas), bayas y frutos pequeños (moras, arándanos, grosellas, bayas de saúco, grosella espinosa, bayas de mirto, frambuesa norteamericana, frambuesas, fresas y uvas), cultivos de bulbos (ajos, puerros, cebollas, chalotas y bulbos ornamentales), frutas cítricas (híbridos de cítricos, toronjas, kumquat, limas, naranjas y pomelos), verduras cucurbitáceas (pepinos, melones, calabazas y calabacines), flores, plantas de semillero, plantas ornamentales, verduras de fruto (berenjena, pimientos dulces y picantes, tomatillos, y tomates), hierbas, especias, mentas, cultivos hidropónicos (pepinos, tomates, lechugas, hierbas y especias), verduras de hoja y cultivos de coles (rúcula, apios, perifollo, endivia, hinojo, lechuga (cogollo y hoja), perejil, achicoria roja, ruibarbo, espinaca, acelga, brécol, coles de Bruselas, repollo, coliflor, berzas, col kale, kohlrabi, y mostaza de hoja), espárragos, legumbres y cultivos de campo (judías verdes y secas, lentejas, guisantes suculentos y secos, y cacahuets), frutas de pomo (peras y membrillos), cultivos de raíces (remolachas, remolacha azucarera, zanahorias, apio-nabo, achicoria, rábano picante, chirivía, rutabaga, salsifi y nabos), árboles de hoja caduca (arce y roble), pinos, granos pequeños (centeno, trigo, sorgo, mijo), frutos con hueso (albaricoques, cerezas, nectarinas, melocotones, ciruelas y ciruelas pasas), nueces (almendras, hayuco, nueces de Brasil, semillas de calabaza, anacardo, castañas, avellanas, nuez del nogal americano, nueces de macadamia, pecanes, pistachos y nueces), cultivos de tubérculos (patatas, batatas, ñames, alcachofa, mandioca y jengibre), y céspedes (grama, campos de deporte, parques, campos de golf establecidos y en preparación, pistas, calles y zonas de matorrales, producción de semillas y producción de céspedes).

35 Para controlar los patógenos diana, las plantas deben cultivarse dentro del área eficaz del agente de biocontrol. Las semillas pueden plantarse en tierra mezclado con agentes de biocontrol. Varios otros métodos de introducción del agente de biocontrol en la planta serían igualmente eficaces. Por ejemplo, el agente de biocontrol puede fermentarse, formularse o envasarse. Después, el agente de biocontrol puede aplicarse a la semilla de la planta por medio de una formulación seca o húmeda y la aplicación a la semilla. Como alternativa, el agente de biocontrol puede producirse en una formulación dentro de surco, en húmedo o en seco, que puede aplicarse a la tierra en la que va a crecer la planta. El agente de biocontrol incluso puede aplicarse como un pulverizado, previsto para utilizar dentro de surco durante la plantación o a la superficie del suelo después de la plantación. El agente también puede aplicarse como una poción a plantas en maceta y puede incorporarse en el medio de crecimiento. Lo que se requiere es que el agente de biocontrol se coloque, por algún medio, en el entorno del suelo adyacente a la planta en crecimiento. Un "patógeno diana" es el patógeno o patógenos, conocidos o desconocidos, que amenazan a la planta de cultivo.

50 Una especie de *Trichoderma harzianum* competente en la rizosfera y una especie de *Trichoderma virens* también pueden ser adecuadas en un método para potenciar el crecimiento de la planta. La especie de *Trichoderma harzianum* competente en la rizosfera y la especie de *Trichoderma virens* se aplican a las plantas bajo condiciones eficaces para potenciar el crecimiento de la planta.

55 Este método se realiza sustancialmente con los mismos materiales y procedimientos descritos anteriormente con referencia al método de controlar enfermedades. Se dirige a afectar a cualquier forma de estimulación o potenciación del crecimiento de la planta. Esto puede producirse tan pronto comienza el crecimiento de la planta desde la semilla o más tarde en la vida de una planta. Por ejemplo, el crecimiento de la planta incluye un mayor rendimiento, una mayor cantidad de semillas producidas, un mayor porcentaje de semillas germinadas, un mayor tamaño de la planta, mayor biomasa, más frutas y más grandes, coloración más temprana de la fruta y maduración más temprana de la fruta y la planta. Como resultado, proporciona significativos beneficios económicos a los cultivadores. Por ejemplo, una germinación temprana y una maduración temprana permiten cultivar en áreas en las

que una corta temporada de cultivo impediría su cultivo en esa localización. Un mayor porcentaje de germinación de las semillas produce unos mejores puestos de cultivo y un uso más eficaz de las semillas. Un mayor rendimiento, un tamaño mayor y una mayor producción de biomasa permiten una mayor generación de ingresos de una parcela de tierra concreta. Así, es evidente que la presente invención constituye un avance significativo en la eficacia agrícola.

## 5 Ejemplos

Los ejemplos que aparecen a continuación se ofrecen con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención descrita en la presente. Se ofrecen estos ejemplos para demostrar la sinergia observada cuando se emplea *Trichoderma harzianum* T22 competente en la rizosfera junto con *Trichoderma virens* G41. Esta sinergia se manifiesta como un notable aumento en el control de enfermedades de plantas provocadas por una amplia diversidad de patógenos. Por último, se ofrece un ejemplo para demostrar la importancia de la competencia en la rizosfera en la interacción y la forma en que afecta la sinergia entre las cepas de *Trichoderma*.

Las cepas microbianas se mantuvieron como sigue:

• T22: se mantuvo en gel de sílice en la nevera del laboratorio y se cultivó en placas de PDA según fuera necesario. Se utilizaron las placas para inocular un medio de crecimiento y este se dejó en incubación durante un periodo de 2 semanas. Las esporas se recolectaron por medio de un tamiz después de la incubación y se emplearon para formular un polvo humectable.

• G41: se mantuvo en gel de sílice en la nevera del laboratorio y se cultivó en placas de PDA según fuera necesario. Se utilizaron las placas para inocular arroz estéril y este se dejó en incubación durante un periodo de 2 semanas. Las esporas se recolectaron por medio de un tamiz después de la incubación y se emplearon para formular un polvo humectable.

• G21: se aisló a partir de un producto disponible en el mercado y se cultivó en placas de PDA según fuera necesario. Se utilizaron las placas para inocular arroz estéril y este se dejó en incubación durante un periodo de 2 semanas. Las esporas se recolectaron por medio de un tamiz después de la incubación y se emplearon para formular un polvo humectable.

• T12: se mantuvo en gel de sílice en la nevera del laboratorio y se cultivó en placas de PDA según fuera necesario. Se utilizaron las placas para inocular arroz estéril y este se dejó en incubación durante un periodo de 2 semanas. Las esporas se recolectaron por medio de un tamiz después de la incubación y se emplearon para formular un polvo humectable.

• Patógenos vegetales: se mantuvieron en placas de agar de PDA a 30°C.

Las esporas de *Trichoderma* se formularon con un vehículo humectable que contenía al menos  $10^7$  unidades formadoras de colonias por gramo. Las plantas se trataron con el material formulado en agua a una concentración de 113 o 226 g/379 l (4 u 8 oz/100 gal).

Ejemplo 1 - Tratamiento de boj infectado por *P. cinnamomi*

Este ejemplo ilustra la eficacia y sinergia de una composición según la presente invención para controlar a *Phytophthora cinnamomi* en plantas de boj.

Se sometieron bojes, *Buxus microphylla asiaticum*, var. 'Winter Gem' a los tratamientos de empapado de suelo indicados en la tabla 1. Excepto por los controles no inoculados, cada planta se trató con un inóculo de *P. cinnamomi* para inducir la enfermedad. Las plantas de boj se obtuvieron de un vivero local y se colocaron en una maceta con un diámetro de 15,24 cm (6 pulgadas) que contenía medio para macetas de corteza de pino:turba (3:1 en volumen:volumen). El medio se enmendó con 6,35 kg (14 libras) de fertilizante 17-7-12 Osmocote por yarda cúbica (0,76 metros cúbicos) de mezcla.

El inóculo de *P. cinnamomi* se cultivó sobre granos de arroz esterilizados durante 14 días a 24-26 °C antes de la inoculación. Para tratar las plantas con el inóculo del patógeno, se perforaron cuatro orificios a una distancia equidistante alrededor de la bola de la raíz y se insertaron cuatro granos de arroz colonizado en cada orificio. Cada uno de los materiales de ensayo se aplicó en la tasa especificada a la superficie del suelo empleando un pulverizador de mano de 1,18 litros (2,5 pintas). El patrón químico, mefenoxamo (Subdue®), se aplicó a la superficie del suelo 24 horas después de que las raíces de la planta fueran inoculadas con el inóculo de *P. cinnamomi*. Se aplicaron T22 y G41 a la superficie del 72 horas antes de la inoculación de las raíces con *P. cinnamomi*.

Se determinó una puntuación de comercialización para cada planta en el día uno después de la inoculación (DAI) con *P. cinnamomi*, 22 días DAI, y 54 días DAI. Empleando la siguiente escala, cada planta fue puntuada por tres investigadores y se determinó el valor promedio para cada planta:

1: Plantas muertas

2: Poco vendible (clorosis grave y poco crecimiento en la parte superior)

3: Moderadamente vendible (ligera clorosis y/o atrofia; crecimiento de la planta entre 2 y 4)

4: Vendible (pocas hojas individuales con clorosis, follaje verde; crecimiento de la planta entre 3 y 5)

5: Salud excelente, vendible (sin clorosis; óptimo crecimiento en la parte superior)

5 En 1, 22, y 54 DAI, se midió la altura de la planta desde el pie hasta el punto más alto de la planta. Se determinó el peso seco de las raíces y el peso fresco de los brotes en 22 y 54 DAI.

10 En 22 DAI, se retiró un subconjunto de plantas de cada tratamiento y se examinó. Las plantas se retiraron de las macetas y el exceso de tierra se cepilló cuidadosamente de las raíces. Las partes aéreas (brotes) se cortaron de las partes subterráneas y se secaron en una estufa. Se registró el peso seco de las raíces y el peso fresco de los brotes. En 54 DAI, el experimento terminó; el resto de las plantas se trató como se indicó anteriormente para determinar el peso seco de las raíces y los brotes. Los datos se sometieron a un análisis de la varianza, y los medios de tratamiento se separaron mediante un ensayo de Student-Newman-Keuls a P = 0,05.

**Tabla 1**

Tratamiento	Tasa
1. Control no inoculado	---
2. Control inoculado	---
3. T22 ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	113 g/379 l (4 oz/100 gal)
4. G41 ( <i>Trichoderma virens</i> )	226 gr/379 l (8 oz/100 gal)
5. T22 + G41	113 gr + 226 gr/379 l (4 oz + 8 oz/100 gal)
6. Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)

15 Los resultados de comercialización se indican en la tabla 2, que demuestra que las plantas tratadas con los agentes de biocontrol combinados T22 y G41 resultaron protegidas frente a los síntomas de enfermedad en desarrollo, en particular comparadas con las plantas tratadas con un único organismo por separado.

**Tabla 2**

Tratamiento	Tasa	Comercialización: escala de 1 (muerta) - 5 (excelente)		
		5/26	6/21	7/10
Control no inoculado	--	5 a	4,3 a	4,7 a
Control inoculado	--	5 a	2,1 d	2,0 d
T22	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	5 a	3,6 bc	3,6 bc
G41	226 gr/379 l (8 oz/100 gal)	5 a	3,4 c	3,4 c
T22 + G41	113 gr + 226 gr/379 l (4 oz + 8 oz/100 gal)	5 a	4,4 a	4,5 a
Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)	5 a	4,4 a	4,7 a
LSD (P = 0,05)		0,0	0,51	0,54
Desviación estándar		0,0	0,57	0,60
CV		0,0	15,18	15,34

Los valores promedio seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes (P = 0,05, Student-Newman-Keuls). Cada valor es un promedio de 10 duplicados.

Los resultados de la altura de las plantas se muestran en la tabla 3, siendo los bojes sometidos a un tratamiento combinado de T22 y G41 sustancialmente más altos que las otras plantas inoculadas, en particular comparadas con las plantas en las que se emplearon estos agentes por separado.

**Tabla 3**

Tratamiento	Tasa	Altura (cm)		
		5/26	6/21	7/10
Control no inoculado	--	12,8 a	36,4 ab	38,0 a
Control inoculado	--	13,0 a	26,6 b	22,5 c
T22	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	13,0 a	23,3 c	30,41 b
G41	226 gr/379 l (8 oz/100 gal)	13,7 a	31,9 b	32,61 b
T22 + G41	113 gr + 226 gr/379 l (4 oz + 8 oz/100 gal)	13,4 a	36,2 ab	41,6 a
Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)	13,8 a	39,7 a	39,8 a
LSD (P = 0,05)		1,97	2,74	2,19
Desviación estándar		2,20	3,05	2,46
CV		16,1	27,5	c

Los valores promedio seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes (P = 0,05, Student-Newman-Keuls). Cada valor es un promedio de 10 duplicados.

Tal como se indica en la tabla 4, los pesos de las raíces y los brotes de los bojes mejoraron significativamente cuando se trataron con la combinación de T22 y G41, en particular comparado con las plantas en las que se emplearon estos agentes por separado.

5

**Tabla 4**

Tratamiento	Tasa	Peso fresco de los brotes (g)		Peso seco de las raíces (g)	
		6/21	7/10	6/21	7/10
Control no inoculado	--	71,6 a	99,5 a	13,5 a	31,8 a
Control inoculado	--	29,7 b	35,3 d	2,4 c	9,1 d
T22	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	39,1 b	69,8 c	8,1 b	14,3 c
G41	226 gr/379 l (8 oz/100 gal)	34,7 b	75,5 bc	9,3 b	15,5 c
T22 + G41	113 gr + 226 gr/379 l (4 oz + 8 oz/100 gal)	84,0 a	93,9 ab	13,6 a	29,4 a
Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)	86,2 a	108,3 a	16,7 a	30,1 a
LSD (P = 0,05)		12,4	16,5	2,7	3,6
Desviación estándar		9,6	12,7	2,2	2,8
CV		17,8	15,5	19,8	12,8

Los valores promedio seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes (P = 0,05, Student-Newman-Keuls). Para cada fecha de evaluación, cada valor es un promedio de 5 duplicados.

**Ejemplo 2 - Tratamiento de boj expuesto a *Phytophthora cinnamomi***

Este ejemplo ilustra la eficacia y sinergia de una composición según la presente invención para controlar a *Phytophthora cinnamomi* en plantas de boj.

10 Los bojes se sometieron a los tratamientos de pulverización indicados en la tabla 5. Excepto por los controles no inoculados, cada planta se trató con un inóculo de *P. cinnamomi* para inducir la enfermedad. La metodología de este ensayo es idéntica a la descrita en el ejemplo 1.

**Tabla 5**

Tratamiento	Tasa
1. Control no inoculado	---
2. Control inoculado	---
3. G41 ( <i>Trichoderma virens</i> )	113 g/379 l (4 oz/100 gal)
4. G41 + T22	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)
5. Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)

Los resultados de comercialización se indican en la tabla 6. El tratamiento combinado de T22 y G41 evita que las plantas desarrollen los síntomas de la enfermedad y la comercialización siguió siendo alta a lo largo del tiempo, en particular cuando se compara con estos tratamientos administrados por separado.

5

**Tabla 6**

Tratamiento	Tasa	Comercialización: escala de 1 (muerta) - 5 (excelente)		
		11/21/04	12/12/04	01/13/05
Control no inoculado	--	5,0 a	4,8 a	4,9 a
Control inoculado	--	5,0 a	2,3 d	1,8 e
G41	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	5,0 a	3,2 c	3,0 d
G41 + T22	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)	5,0 a	4,5 a	4,5 ab
Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)	5,0 a	4,6 a	4,7 ab
LSD (P = 0,05)		0,0	0,46	0,56
Desviación estándar		0,0	0,52	0,63
CV		0,0	12,94	16,24

Los valores promedio seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes (P = 0,05, Student-Newman-Keuls). Cada valor es un promedio de 10 duplicados.

Los resultados de la altura de la plantas se muestran en la tabla 7. Los bojes que se sometieron al tratamiento combinado de T22 y G41 fueron sustancialmente más altos que las otras plantas, en particular comparados con las plantas en las que se emplearon estos agentes por separado. grandal

**Tabla 7**

Tratamiento	Tasa	Altura (cm)		
		11/21/04	12/12/04	01/13/05
Control no inoculado	--	12,9 ab	37,4a	40,5 a
Control inoculado	--	14,5 a	28,2 d	23,9 e
G41	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	12,9 ab	30,1 cd	29,5 d
G41 + T22	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)	11,6 b	34,2 ab	37,7 ab
Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)	13,3 ab	34,6 ab	36,7 ab
LSD (P = 0,05)		1,39	3,61	3,26
Desviación estándar		1,56	4,03	3,64
CV		11,7	12,2	10,7

Los valores promedio seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes (P = 0,05, Student-Newman-Keuls). Cada valor es un promedio de 10 duplicados.

10 Tal como se indica en la tabla 8, los pesos de las raíces y los brotes de los bojes mejoraron significativamente

cuando se trataron con la combinación de T22 y G41. Las plantas tratadas solo con G41 presentaban unos pesos de las raíces y de los brotes significativamente menores.

Tabla 8

Tratamiento	Tasa	Peso fresco de los brotes (g)		Peso seco de las raíces (g)	
		12/12	1/13	12/12	1/13
Control no inoculado	--	65,8 a	87,2 a	78,9 a	104,2 a
Control inoculado	--	30,9 c	33,7 c	28,7 d	28,1 d
G41	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	34,4 c	39,6 c	26,4 d	33,5 cd
G41 + T22	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)	59,8 ab	76,5 a	70,7ab	91,1 ab
Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)	64,8 a	81,6 a	76,4 a	96,0 ab
LSD (P = 0,05)		13,6	14,6	13,1	15,3
Desviación estándar		10,5	11,3	10,1	11,8
CV		20,9	17,4	17,3	16,4

Los valores promedio seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes (P = 0,05, Student-Newman-Keuls). Para cada fecha de evaluación, cada valor es un promedio de 5 duplicados.

Ejemplo 3 - Tratamiento de azaleas expuestas a *Phytophthora nicotianae*

- 5 Este ejemplo ilustra la eficacia y sinergia de una composición según la presente invención para controlar a *Phytophthora nicotianae* en plantas de azalea.

Plantas de azalea, *Rhododendron obtusum*, var. 'Pink Happy Days' se sometieron a los tratamientos de pulverización indicados en la tabla 9. Excepto por los controles no inoculados, cada planta se trató con un inóculo de *P. nicotianae* para inducir la enfermedad. La metodología de este ensayo es idéntica a la descrita en el ejemplo 1.

10

Tabla 9

Tratamiento	Tasa
1. Control no inoculado	---
2. Control inoculado	---
3. G41 ( <i>Trichoderma virens</i> )	113 g/379 l (4 oz/100 gal)
4. G41 + T22	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)
5. Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)

Los resultados de comercialización se indican en la tabla 10. La comercialización se mantuvo a lo largo del desarrollo del experimento en las plantas tratadas con la combinación de los agentes de biocontrol T22 y G41; la protección frente a los síntomas de la enfermedad fue idéntica a la del patrón químico.

Tabla 10

Tratamiento	Tasa	Comercialización: escala de 1 (muerta) - 5 (excelente)		
		11/25/04	12/17/04	1/6/05
Control no inoculado	--	5 a	4,9 a	4,8 a
Control inoculado	--	5 a	2,6 c	1,7 d
G41	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	5 a	3,0 c	2,6 c
G41 + T22	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)	5 a	4,4 ab	4,2 ab
Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)	5 a	4,4 ab	4,4 ab

Tratamiento	Tasa	Comercialización: escala de 1 (muerta) - 5 (excelente)		
		11/25/04	12/17/04	1/6/05
LSD (P = 0,05)		0,0	0,63	0,60
Desviación estándar		0,0	0 0,70	0,67
CV		0,0	17,7	18,1
Los valores promedio seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes (P = 0,05, Student-Newman-Keuls). Cada valor es un promedio de 10 duplicados.				

Los resultados de las evaluaciones de la altura se indican en la tabla 11. Las plantas tratadas con la combinación de T22 y G41 fueron significativamente más altas que las plantas tratadas solo con G41, e iguales en altura que las plantas tratadas con el patrón químico.

Tabla 11

Tratamiento	Tasa	Altura (cm)		
		11/25/04	12/17/04	1/6/05
Control no inoculado	--	13,8 a	29,4 a	38,7 a
Control inoculado	--	14,1 a	13,5 e	11,5 c
G41	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	14,2 a	20,5 d	25,8 d
G41 + T22	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)	11,7 a	24,1 bcd	32,9 bc
Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)	13,7 a	27,5 ab	35,5 ab
LSD (P = 0,05)		1,18	2,89	4,07
Desviación estándar		1,32	3,23	4,55
CV		9,61	13,7	15,2
Los valores promedio seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes (P = 0,05, Student-Newman-Keuls). Cada valor es un promedio de 10 duplicados.				

- 5 Los resultados del peso fresco de los brotes y del peso seco de las raíces se indican en la tabla 12. Los pesos de las raíces y los brotes fueron significativamente mayores en plantas tratadas con la combinación de G41 y T22, que en las plantas tratadas solo con G41.

Tabla 12

Tratamiento	Tasa	Peso fresco de los brotes (g)		Peso seco de las raíces (g)	
		6/21	7/10	6/21	7/10
Control no inoculado	--	52,8 a	78,2 a	45,5 a	60,7 a
Control inoculado	--	21,9 d	23,5 f	21,3 d	12,1 e
G41	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	33,8 c	41,2 e	25,2 cd	33,1 d
G41 + T22	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)	45,2 ab	54,2 d	31,3 bc	44,8 c
Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)	49,0 ab	70,3 ab	44,2 a	55,5 ab
LSD (P = 0,05)		6,9	8,62	6,31	7,73
Desviación estándar		5,34	6,67	4,88	5,99
CV		12,7	12,6	14,6	14,0
Los valores promedio seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes (P = 0,05, Student-Newman-Keuls). Para cada fecha de evaluación, cada valor es un promedio de 5 duplicados.					

Ejemplo 4 - Tratamiento de tomates expuestos a *Fusarium oxysporum*

Este ejemplo ilustra la eficacia y sinergia de una composición según la presente invención para controlar a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plantas de tomate.

5 Plántulas de tomate, *Lycopersicon esculentum*, var *esculentum* 'Beefsteak', se sometieron a los tratamientos de empapado de suelo indicados en la tabla 13. Excepto por los controles no inoculados, cada planta se trató con un inóculo del patógeno *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* para inducir la enfermedad.

10 Los tomates comenzaron en parcelas de 128 células a partir de semillas en un medio de crecimiento con una base de turba generalista. Las plantas se regaron con una disolución de 100 ppm de 20-20-20 alimento para plantas hidrosoluble (Jack's Classic). A los 4-5 días después de plantar, las plántulas se empaparon con los materiales biológicos mezclados en agua. Las plántulas que no recibieron tratamiento en este momento fueron tratadas solo con la formulación en blanco (sin *Trichoderma*).

15 Se cultivó un inóculo de *F. oxysporum* sobre granos de arroz esterilizados durante 7 días a 24-26 °C. El arroz se mezcló de modo uniforme con el medio de crecimiento a una tasa de 5% (en peso:peso). Se trasplantaron plántulas de tomate de siete días a macetas de 10 cm (4 pulgadas) que contenían el inóculo del patógeno sobre arroz. Se trasplantó un conjunto de plántulas control no tratadas a macetas que contenían el medio de crecimiento más arroz no inoculado. Un conjunto de plántulas se empapó con la tasa indicada en la etiqueta de mefenoxamo para actuar como patrón de fungicida químico, y un conjunto de plántulas control tratadas se trasplantó a un medio que contenía el patógeno.

20 Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 20-24 °C con un ciclo de 12 horas de luz:oscuridad. Las plantas se regaron con una disolución nutritiva, tal como se describió anteriormente. En 28 DAI, el experimento terminó, y cada planta se cortó en dos porciones: raíces (subterráneas) y brotes (aéreos). El material se secó en una estufa a 60° C hasta que estuvo completamente seco (aproximadamente 24 horas) y se registraron los pesos. Los datos se sometieron a un ANOVA de una vía tras una corrección de Bonferroni. Las diferencias significativas entre los medios de tratamiento se determinaron empleando un ensayo HSD de Tukey a P = 0,05.

25

**Tabla 13**

Tratamiento	Concentración
1. Control no inoculado	---
2. Control inoculado	---
3. T22 ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	113 g/379 l (4 oz/100 gal)
4. G41 ( <i>Trichoderma virens</i> )	113 g/379 l (4 oz/100 gal)
5. T22 + G41	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)
6. Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)

Tal como se indica en la tabla 14, los pesos de las raíces y los brotes de los tomates mejoraron significativamente cuando se trataron con la combinación de T22 y G41, en particular comparado con el caso en que estos agentes se emplearon por separado y en comparación con el patrón químico.

**Tabla 14**

Tratamiento	Tasa	Peso seco de los brotes (g)	Peso seco de las raíces (g)
Control no inoculado	--	1,33 ab	0,17 b
Control inoculado	--	0,60 c	0,06 c
T22	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	0,91 bc	0,16 b
G41	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	0,87 c	0,12 bc
G41 + T22	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)	1,50 a	0,30 a
Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)	0,90 bc	0,12 bc

Tratamiento	Tasa	Peso seco de los brotes (g)	Peso seco de las raíces (g)
HSD de Tukey (P = 0,05)		0,44	0,10
Los valores promedio en cada columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según HSD de Tukey HSD (P = 0,05). Para cada tratamiento, cada valor es un promedio de 28 duplicados (plantas).			

Ejemplo 5 - Tratamiento de tomates expuestos a *Pythium irregulare*

Este ejemplo ilustra la eficacia y sinergia de una composición según la presente invención para controlar a *Pythium irregulare* en plantas de tomate.

5 Plántulas de tomate, *Lycopersicon esculentum*, var *esculentum* 'Beefsteak', se sometieron a los tratamientos de empapado de suelo indicados en la tabla 13. Excepto por los controles no inoculados, cada planta se trató con un inóculo del patógeno *Pythium irregulare* para inducir la enfermedad.

10 Las plántulas de tomate se cultivaron y se trataron como se describió anteriormente en el ejemplo 2. Se inoculó arroz estéril con una suspensión de *P. irregulare* a la tasa de 1 placa Petri de PDA colonizada/1 litro de agua estéril. Se incubó arroz durante 24 horas a 24-26 °C. El arroz infestado se mezcló de modo uniforme con el medio de crecimiento a una tasa de 5% (en peso:peso).

15 Las plántulas de tomate se trasplantaron a macetas de 10 cm (4 pulgadas) que contenían el inóculo del patógeno sobre arroz. Se trasplantó un conjunto de plántulas control no tratadas a macetas que contenían el medio de crecimiento más arroz, pero no patógeno. Un conjunto de plántulas se empapó con la tasa indicada en la etiqueta de mefenoxamo para actuar como patrón de fungicida químico, y un conjunto de plántulas control tratadas se trasplantó a un medio que contenía el patógeno.

Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 20-24 °C con un ciclo de 12 horas de luz:oscuridad. Las plantas se regaron con una disolución nutriente, tal como se describió anteriormente. En 21 DAI, el experimento terminó, y cada planta se separó en dos porciones: raíces (subterráneas) y brotes (aéreos). El material se secó en una estufa hasta que estuvo completamente seco (aproximadamente 24 horas) y se registraron los pesos.

20 Tal como se indica en la tabla 15, los pesos de las raíces y los brotes de las plantas de tomate mejoraron significativamente cuando se trataron con la combinación de T22 y G41, en particular comparado con el caso en que estos agentes se emplearon por separado y en comparación con el patrón químico.

Tabla 15

Tratamiento	Tasa	Peso seco de los brotes (g)	Peso seco de las raíces (g)
Control no inoculado	--	0,52 a	0,07 a
Control inoculado	--	0,37 bcd	0,06 ab
T22	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	0,32 cd	0,05 b
G41	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	0,39 bc	0,06 ab
G41 + T22	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)	0,43 ab	0,07 a
Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)	0,28 d	0,04 c
HSD de Tukey (P = 0,05)		0,10	0,02
Los valores promedio en cada columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según HSD de Tukey HSD (P = 0,05). Para cada tratamiento, cada valor es un promedio de 28 duplicados (plantas).			

Ejemplo 6 - Tratamiento de semillas de pepino para protegerlas frente a *Pythium aphanidermatum*

25 Este ejemplo ilustra la eficacia y sinergia de una composición según la presente invención aplicada como revestimiento de semillas para controlar a *Pythium aphanidermatum* en plántulas de pepino.

Semillas de pepino, *Cucumis sativus*, var Marketmore 76 fueron revestidas con *T. harzianum* y/o *T. virens*, o mfenoxamo según se describe en Pill *et al.* (Pill *et al.*, Scientia Horticulturae, 121:54-62 (2009)). Las semillas se plantaron en parcelas con o sin inóculo de *P. aphanidermatum*. El experimento se realizó en un invernadero con luz

natural y ajustando la temperatura a 25/22 °C (día/noche). El número de plántulas que emergieron se registró a diario hasta que no se produjeron más incrementos durante dos días consecutivos. Las plantas enfermas se registraron como preemergentes (no emergieron plántulas) o postemergentes (inclinación de los brotes). Estos datos se sometieron a un análisis de la varianza, y los medios se separaron mediante un ensayo de LSD a  $P = 0,05$ .

- 5 Tal como se indica en la tabla 16, el porcentaje de enfermedad del vivero (preemergencia y total) se redujo significativamente cuando las semillas fueron tratadas con la combinación de T22 y G41, en particular comparado con el caso en que estos agentes se emplearon por separado y en comparación con el patrón químico.

Tabla 16

Tratamiento de las semillas	Porcentaje de enfermedad del vivero	
	Preemergencia	Total
Ninguno	19,4 a	33,3 a
T22	7,0 b	15,9 b
G41	2,3 bc	9,8 c
G41 + T22	0 c	0 d
Mefenoxamo	4,6 bc	9,3 c

Los valores promedio en cada columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según LSD ( $P = 0,05$ ).

Ejemplo 7 - Tratamiento de tomates expuestos a *Rhizoctonia solani*

- 10 Este ejemplo ilustra la eficacia y sinergia de una composición según la presente invención para controlar a *Rhizoctonia solani* en plantas de tomate.

Plántulas de tomate, *Lycopersicon esculentum*, var *esculentum* 'Beefsteak', se sometieron a los tratamientos de empapado de suelo indicados en la tabla 13, excepto que no se introdujeron plantas control no tratadas. Excepto por los controles no inoculados, cada planta se trató con un inóculo del patógeno *R. solani* para inducir la enfermedad.

- 15 Las plántulas de tomate se cultivaron y se trataron como se describió anteriormente en el ejemplo 2. Se inoculó arroz estéril con lechos cortos de agar procedentes de placas Petri de PDA que contenían colonias en crecimiento de *R. solani* a una tasa de un placa de PDA colonizada/500 g de arroz. Se incubó arroz durante 10 días a 24-26 °C. El arroz infestado se mezcló de modo uniforme con el medio de crecimiento a una tasa de 5% (en peso:peso).

- 20 Las plántulas de tomate se trasplantaron a macetas de aproximadamente 10 cm (4 pulgadas) que contenían el inóculo del patógeno sobre arroz. Las plantas de comprobación no tratadas se contaminaron con una enfermedad desconocida y no fueron incluidas en el análisis. Un conjunto de plántulas se empapó con la tasa indicada en la etiqueta de mefenoxamo para actuar como patrón de fungicida químico, y un conjunto de plántulas control tratadas se trasplantó a un medio que contenía el patógeno.

- 25 Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 20-24 °C con un ciclo de 12 horas de luz:oscuridad. Las plantas se regaron con una disolución nutriente, tal como se describió anteriormente. En 23 DAI, el experimento terminó, y cada planta se separó en dos porciones: raíces (subterráneas) y brotes (aéreos). El material se secó en una estufa a 60° C hasta que estuvo completamente seco (aproximadamente 24 horas) y se registraron los pesos. Los datos se analizaron como se describió en el anterior ejemplo 2.

- 30 Tal como se indica en la tabla 17, los pesos de las raíces y los brotes de las plantas de tomate mejoraron significativamente cuando se trataron con la combinación de T22 y G41, en particular comparado con el caso en que estos agentes se emplearon por separado y en comparación con el patrón químico.

Tabla 17

Tratamiento	Tasa	Peso seco de los brotes (g)	Peso seco de las raíces (g)
Control inoculado	--	0,52 bc	0,06 b
T22	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	0,67 b	0,09 ab
G41	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	0,61 b	0,08 ab
T22 + G41	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)	0,86 a	0,11 a

Tratamiento	Tasa	Peso seco de los brotes (g)	Peso seco de las raíces (g)
Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)	0,42 c	0,06 b
HSD de Tukey (P = 0,05)		0,10	0,02
Los valores promedio en cada columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según HSD de Tukey HSD (P = 0,05). Para cada tratamiento, cada valor es un promedio de 28 duplicados (plantas).			

Ejemplo 8 - Demostración de la importancia de la competencia en la rizosfera para la sinergia

Parte I. Evaluación de la competencia relativa en la rizosfera

Evaluación de la competencia relativa en la rizosfera de T22 y G41

5 La competencia en la rizosfera se midió en plántulas de maíz empleando la metodología descrita (Chao *et al.*, *Phytopathology*, 76:60-65 (1986)). Se plantaron plántulas de maíz tratadas con T22 y G41 en tubos de láminas de aluminio que contenían tierra estéril. Después de 10 días, los tubos se desenrollaron cuidadosamente; las raíces de las plantas se cortaron en segmentos de 2,54 cm (1 pulgada) desde el ápice hasta el pie de la planta. Cada segmento se ensayó para la cantidad relativa de cada cepa de *Trichoderma*.

10 La figura 1 muestra las poblaciones relativas de T22 y G41 (como porcentajes de la población total de *Trichoderma*) encontradas en los segmentos de raíces de aproximadamente 2,5 cm (1 pulgada) de maíz tratado. Se descubrió que G41 habitaba principalmente en los aproximadamente 10-13 cm (4-5 pulgadas) superiores directamente por debajo de la línea del suelo, mientras que se descubrió que T22 habitaba las raíces de los aproximadamente 15-20 cm (6-8 pulgadas) inferiores. Esto indica que las poblaciones de T22 crecen a lo largo del ápice radicular, mientras que las poblaciones de G41 principalmente habitan las porciones superiores de la raíz. Según Sivan y Harman (Sivan y Harman, *J. Gen. Microbiol.*, 137: 23-29 (1991)), la capacidad de T22 para crecer a lo largo del ápice radicular hace que sea competente en la rizosfera, comparado con G41, que no crece a lo largo de las porciones inferiores de la raíz y el ápice radicular. Mediante la inhibición de las diferentes porciones de la raíz, las poblaciones de T22 y G41 evitan la competencia directa por el espacio y los nutrientes.

Parte II. Importancia de la competencia en la rizosfera para el biocontrol

20 Para demostrar la importancia de la competencia en la rizosfera para la sinergia y una actividad de biocontrol potenciada cuando se combinan dos cepas de *Trichoderma*, se realizaron ensayos *in vivo* en plantas expuestas a patógenos. En el experimento 1, se evaluó la eficacia de una combinación de T22 con una cepa alternativa de *T. virens*, cepa G21. En el experimento 2, se evaluó la eficacia de una combinación de una cepa no competente en la rizosfera de *T. harzianum*, cepa T12, y G41,.

25 Experimento 1. Demostración de la sinergia con una combinación de T22 y G21

Plántulas de pepino, *Cucumis sativus* var Marketmore 76, se sometieron a los tratamientos de empapado de suelo indicados en la tabla 18. Excepto por los controles no inoculados, cada planta se trató con un inóculo del patógeno *Pythium irregulare* para inducir la enfermedad.

30 Las plántulas se cultivaron y se trataron como se describió anteriormente en el ejemplo 4. Se inoculó arroz estéril con una suspensión de *P. irregulare* a la tasa de una placa Petri de PDA colonizada/1 litro de agua estéril. Se incubó arroz durante 24 horas a 24-26 °C. El arroz infestado se mezcló de modo uniforme con el medio de crecimiento a una tasa de 5% (en peso:peso).

35 Las plántulas de pepino se trasplantaron a macetas de 10 cm (4 pulgadas) que contenían el inóculo del patógeno sobre arroz. Se trasplantó un conjunto de plántulas control no tratadas a macetas que contenían el medio de crecimiento más arroz, pero no patógeno. Un conjunto de plántulas se empapó con la tasa indicada en la etiqueta de mefenoxamo para actuar como patrón de fungicida químico, y un conjunto de plántulas control tratadas se trasplantó a un medio que contenía el patógeno.

40 Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 20-24 °C con un ciclo de 12 horas de luz:oscuridad. En 28 DAI, el experimento terminó, y cada planta se separó en dos porciones: raíces (subterráneas) y brotes (aéreos). El material se secó en una estufa a 60° C hasta que estuvo completamente seco (aproximadamente 24 horas) y se registraron los pesos. Los datos se analizaron como se describió en el ejemplo 4.

Tabla 18

Tratamiento	Tasa
1. Control no inoculado	---

Tratamiento	Tasa
2. Control inoculado	---
3. T22 ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	113 g/379 l (4 oz/100 gal)
4. G41 ( <i>Trichoderma virens</i> )	113 g/379 l (4 oz/100 gal)
5. T22 + G41	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)
6. Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)

Tal como se indica en la tabla 19, los pesos de las raíces y los brotes de las plantas de pepino mejoraron significativamente cuando se trataron con la combinación de T22 y G21, en particular comparado con el caso en que estos agentes se emplearon por separado y en comparación con el patrón químico. Estos datos demuestran que cuando se combina T22, una cepa competente en la rizosfera de *Trichoderma harzianum*, con una cepa alternativa de *T. virens*, aún se observa un efecto sinérgico y la eficacia resulta potenciada.

5

Tabla 19

Tratamiento	Tasa	Peso seco de los brotes (g)	Peso seco de las raíces (g)
Control no inoculado	--	0,84 a	0,14 a
Control inoculado	--	0,37 c	0,07 c
T22	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	0,58 b	0,10 abc
G41	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	0,48 bc	0,08 c
T22 + G41	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)	0,88 a	0,13 ab
Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)	0,66 ab	0,10 abc
HSD de Tukey (P = 0,05)		0,19	0,05
Los valores promedio en cada columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según HSD de Tukey HSD (P = 0,05). Para cada tratamiento, cada valor es un promedio de 14 duplicados (plantas).			

Experimento 2. Demostración de la pérdida de sinergia con una combinación de T12 y G41

Se ha demostrado que la cepa T12 de *Trichoderma harzianum* (ATCC 20737) no posee la capacidad de crecer a lo largo del ápice radicular. Así, no es una cepa competente en la rizosfera (Chao *et al.*, "Colonization of the Rhizosphere by Biological Control Agents Applied to Seeds," *Phytopathology*, 76:60-65 (1986)). Este experimento se realizó para demostrar la pérdida de sinergia cuando se emplea una cepa no competente en la rizosfera de *T. harzianum* para el control de la enfermedad.

10

Plántulas de tomate, *Lycopersicon esculentum*, var *esculentum* 'Beefsteak', se sometieron a los tratamientos de empapado de suelo indicados en la tabla 20. Excepto por los controles no inoculados, cada planta se trató con un inóculo del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* para inducir la enfermedad. Los procedimientos experimentales y el análisis de los datos fueron idénticos a los descritos en el ejemplo 4.

15

Tabla 20

Tratamiento	Tasa
1. Control no inoculado	---
2. Control inoculado	---
3. T12 ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	113 g/379 l (4 oz/100 gal)
4. G41 ( <i>Trichoderma virens</i> )	113 g/379 l (4 oz/100 gal)
5. T12 + G41	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)
6. Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)

Tal como se indica en la tabla 21, los pesos de las raíces y los brotes de las plantas de tomate no fueron

5 significativamente diferentes en el tratamiento con la combinación de T12+G41, comparado con el caso en que estos agentes se emplearon por separado y en comparación con el patrón químico. Estos datos demuestran que cuando se combina T12, una cepa no competente en la rizosfera de *Trichoderma harzianum*, con una cepa de *Trichoderma virens* no se observa efecto sinérgico. Esto puede ser debido a la incapacidad de T12 de crecer a lo largo de las raíces en avance y de proteger a los ápices radiculares vulnerables frente al ataque de patógenos. Además, T12 puede competir por los nutrientes y el espacio con G41 en las porciones superiores de la zona radicular.

**Tabla 21**

<b>Tratamiento</b>	<b>Tasa</b>	<b>Peso seco de los brotes (g)</b>	<b>Peso seco de las raíces (g)</b>
Control no inoculado	--	0,70 a	0,05 a
Control inoculado	--	0,39 bc	0,03 b
T12	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	0,52 ab	0,05 a
G41	113 g/379 l (4 oz/100 gal)	0,54 ab	0,05 a
T12 + G41	113 gr + 113 gr/379 l (4 oz + 4 oz/100 gal)	0,50 ab	0,05 a
Mefenoxamo	28 gr/379 l (1 oz/100 gal)	0,17 c	0,03 b
HSD de Tukey (P = 0,05)		0,23	0,02
Los valores promedio en cada columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según HSD de Tukey HSD (P = 0,05). Para cada tratamiento, cada valor es un promedio de 14 duplicados (plantas).			

Aunque se han mostrado las realizaciones preferidas y estas se han descrito en detalle en la presente, el alcance de la invención se define en las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un método para controlar enfermedades de plantas mediadas por especies de *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Thielaviopsis*, y/o *Sclerotium*, comprendiendo dicho método:
- proporcionar una especie competente en la rizosfera de *Trichoderma harzianum* T22;
- 5 proporcionar una especie de *Trichoderma virens* G41; y
- aplicar la especie de *Trichoderma harzianum* y la especie de *Trichoderma virens* a plantas en crecimiento bajo condiciones eficaces para tratar las enfermedades de plantas mediadas por especies de *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, y/o *Thielaviopsis*.
- 10 2.- El método de la reivindicación 1, en el que la enfermedad de la planta está mediada por una especie de *Phytophthora* seleccionada del grupo que consiste en *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora citricola*, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora drechsleri*, *Phytophthora infestans* y *Phytophthora nicotiana*.
- 3.- El método de la reivindicación 1, en el que la enfermedad de la planta está mediada por una especie de *Pythium* seleccionada del grupo que consiste en *Pythium aphanidermatum*, *Pythium irregulare*, y *Pythium ultimum*.
- 15 4.- El método de la reivindicación 1, en el que la enfermedad de la planta está mediada por *Fusarium oxysporum*.
- 5.- El método de la reivindicación 1, en el que la enfermedad de la planta está mediada por *Rhizoctonia solani*.
- 6.- El método de la reivindicación 1, en el que la enfermedad de la planta está mediada por *Thielaviopsis basicola*.
- 7.- El método de la reivindicación 1, en el que la enfermedad de la planta está mediada por *Sclerotium rolfsii*.
- 20 8.- El método de la reivindicación 1, en el que la planta en crecimiento se selecciona del grupo que consiste en flores, plantas de semillero, plantas ornamentales, verduras de fruto, cultivos hidropónicos, verduras de hoja y cultivos de coles, frutas de pomo, árboles de hoja caduca, uvas, cítricos, pinos, frutas de hueso, nueces de árboles, granos y hierbas.
- 9.- El método de la reivindicación 1, en el que dicha aplicación se realiza mediante aplicación de emisión, aplicación dentro de surco líquida o seca, empapado de plantas en maceta, incorporación directa al suelo o a mezclas de
- 25 plantación de invernadero, o formulaciones granulares o gránulos.
- 10.- El método de la reivindicación 1, en el que la especie competente en la rizosfera de *Trichoderma harzianum* y la especie de *Trichoderma virens* se proporcionan en forma de una composición de biocontrol, y dicha aplicación se realiza aplicando la composición de biocontrol.
- 11.- El método de la reivindicación 10, en el que la composición de biocontrol comprende además un vehículo.
- 30 12.- El método de la reivindicación 11, en el que el vehículo se selecciona del grupo que consiste en agua, disoluciones acuosas, suspensiones, gránulos y polvos.
- 13.- El método de la reivindicación 10, en el que la composición de biocontrol comprende además un aditivo seleccionado del grupo que consiste en fertilizantes, insecticidas, fungicidas, nematocidas y sus mezclas.

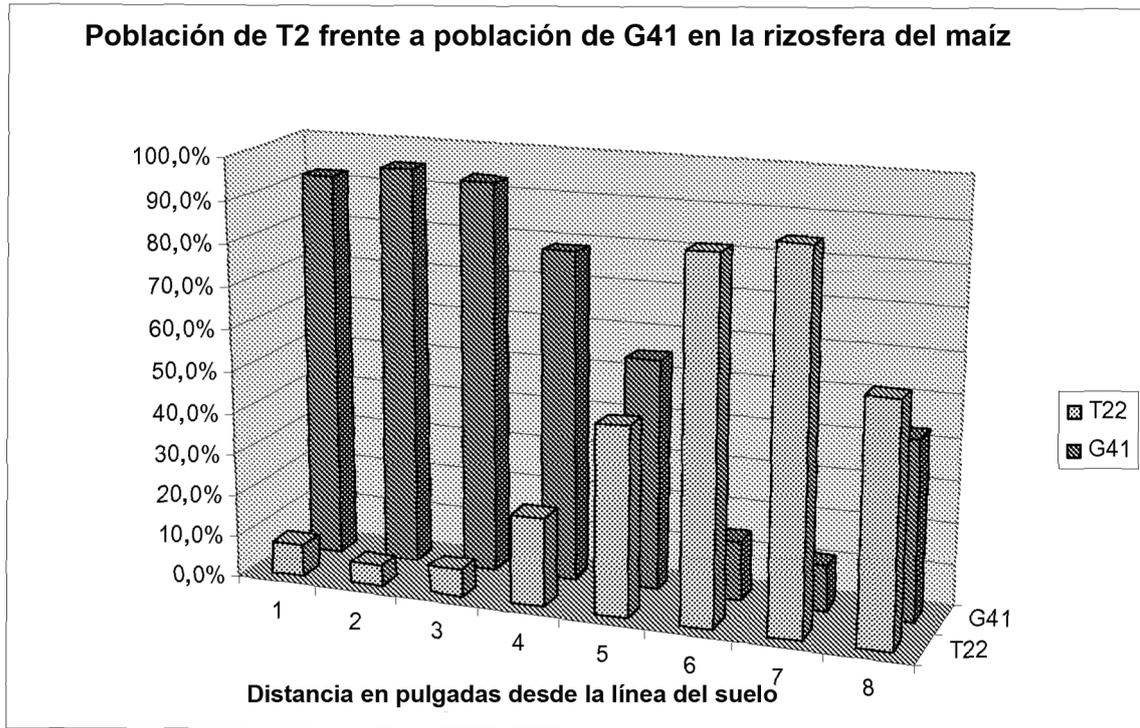


Figura 1