

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 873**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14	(2006.01)
A01H 17/00	(2006.01)
A01N 63/04	(2006.01)
A01P 21/00	(2006.01)
A01P 3/00	(2006.01)
C12N 3/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2014 PCT/CA2014/000683**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015 WO15035504**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2014 E 14843455 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 3044307**

54 Título: **Cepa aislada de Clonostachys rosea para su uso como agente de control biológico**

30 Prioridad:

11.09.2013 US 201361876469 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2019

73 Titular/es:

**BEE VECTORING TECHNOLOGY INC. (100.0%)
4160 Sladeview Crescent No.7
Mississauga, Ontario L5L 0A1, CA**

72 Inventor/es:

**SUTTON, JOHN y
MASON, TODD GORDON**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 714 873 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

Cepa aislada de *Clonostachys rosea* para su uso como agente de control biológico

5 Campo técnico de la invención

La presente divulgación se refiere a una cepa aislada del hongo *Clonostachys rosea* y más específicamente a una cepa aislada de *Clonostachys rosea* para uso como agente de control biológico para el tratamiento de plantas.

10 Antecedentes

Clonostachys rosea f. *rosea* es un microhongo beneficioso que se encuentra dentro de los tejidos de una diversidad de plantas en la naturaleza y en casi todas las especies de plantas de cultivo. El hongo es común en raíces, hojas, tallos, flores y frutos sanos de plantas recolectadas en granjas y en viveros, huertos, viñedos, pastizales y jardines
15 alrededor del mundo. Se ha reportado en plantas y suelos de regiones tan diversas como las zonas subárticas, templadas frías y cálidas, los desiertos y los trópicos húmedos. Las plantas colonizadas por *C. rosea* no muestran signos visuales de que el hongo está presente hasta que los tejidos experimentan senescencia y mueren naturalmente. En ese momento, el hongo puede esporular y el crecimiento blanquecino puede hacerse visible en las superficies de las plantas, especialmente con la ayuda de una lente de mano. A diferencia de los organismos patógenos asociados con enfermedades, *Clonostachys* no causa lesiones, manchas, marchitamiento u otros síntomas en las plantas. También se sabe que *Clonostachys rosea* f. *rosea* es un agente de control biológico beneficioso para el tratamiento de las plantas y ayuda a proteger las plantas contra las enfermedades y el estrés ambiental, y promueve el crecimiento y la productividad de las plantas.

25 Stewart y col. (patente de Estados Unidos No. 8.101.551) describe la cepa 88-710 de *Clonostachys rosea* y se refiere a la cepa que tiene beneficios para la promoción del vigor, la salud, el crecimiento y el rendimiento de la planta.

Sigue existiendo la necesidad de nuevas cepas de *Clonostachys rosea* que sean útiles como agentes de control biológico para el tratamiento de plantas.

30 Sumario

La presente invención está dirigida a la materia expuesta en las reivindicaciones adjuntas.

35 Los inventores han aislado y caracterizado una nueva cepa del hongo *Clonostachys rosea* f. *rosea*. Como se describe en el presente documento, esta nueva cepa de *Clonostachys rosea* f. *rosea* denominada "BVT Cr-7", es particularmente útil como agente de control biológico para el tratamiento de plantas. En un aspecto de la divulgación, un cultivo aislado de *cepa BVT Cr-7 de Clonostachys rosea* f. *rosea* se depositó con el número de registro 040913-01 en la Autoridad Internacional de Depósito de Canadá ubicada en el Laboratorio Nacional de Microbiología, Agencia de Salud Pública de Canadá, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canadá el 4 de septiembre de 2013.

40 Como se expone en el Ejemplo 1, se aislaron y caracterizaron una serie de cepas diferentes de *Clonostachys rosea* f. *rosea* para identificar cepas con propiedades particularmente ventajosas para uso como agente de control biológico. En comparación con otras cepas de *Clonostachys rosea* f. *rosea*, BVT Cr-7 demostró una serie de propiedades mejoradas y/o una combinación de propiedades deseables para usar como agente de control biológico. Por ejemplo, BVT Cr-7 demostró propiedades mejoradas o deseables con respecto al crecimiento y la abundancia de la producción de esporas, su capacidad para establecerse endofíticamente dentro de una amplia gama de plantas, incluso en las raíces de las plantas de cultivo y en las flores y el follaje de las plantas de prueba y su capacidad para suprimir o controlar un amplio espectro de enfermedades de plantas y/o patógenos. En una realización, BVT Cr-7 muestra una o más propiedades mejoradas en comparación con una cepa de control de *Clonostachys rosea* f. *rosea*, tal como 88-710 y/o EV1a.

45 Además, como se expone en los Ejemplos 2-5, la aplicación de BVT Cr-7 a plantas en ensayos de campo así como en invernaderos bajo condiciones controladas demuestra que BVT Cr-7 es un agente de control biológico de amplio espectro con alto rendimiento contra una serie de enfermedades diferentes, en diversas condiciones y para una amplia variedad de plantas. Como se muestra en el Ejemplo 4, BVT Cr-7 también es útil para reducir el deterioro de los materiales vegetales, por ejemplo, al reducir los niveles de podredumbre o decoloración en los cultivos cosechados.

60 Por consiguiente, en un aspecto se proporciona un cultivo aislado de *cepa BVT Cr-7 de Clonostachys rosea* f. *rosea* como se describe en el presente documento. En una realización, la cepa es la depositada bajo el número de acceso 040913-01 en la Autoridad Internacional de Depósito de Canadá ubicada en el Laboratorio Nacional de Microbiología, Agencia de Salud Pública de Canadá, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canadá el 4 de septiembre de 2013.

65 También se proporcionan esporas generadas a partir de, así como la progenie de la cepa BVT Cr-7 de *Clonostachys rosea* f. *rosea* y formulaciones que contienen cultivos aislados, esporas y/o progenie de BVT Cr-7. También se

proporciona una célula aislada de la cepa BVT Cr-7 de *Clonostachys rosea* f. *rosea* que es capaz de reproducirse asexualmente. En una realización, se proporciona una espora obtenida incubando un cultivo aislado de BVT Cr-7 en un sustrato en condiciones adecuadas para la esporulación. En una realización, se proporciona una formulación que comprende esporas de BVT Cr-7 que están unidas a un agente estabilizante, tal como silicato de calcio.

En una realización, el cultivo aislado de BVT Cr-7 descrito en este documento coloniza las plantas como un endófito. En una realización, el contacto de una planta con BVT Cr-7 suprime o controla una enfermedad o patógeno que afecta el follaje, las flores, los frutos y/o las raíces de la planta. En una realización, la enfermedad es la enfermedad del moho gris, la enfermedad del moho blanco, la podredumbre parda, la podredumbre de la raíz y/o la phomopsis. En una forma de realización, la enfermedad es causada por *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y/o por especies de *Pythium* spp., *Rhizoctonia* y/o *Fusarium*.

En una realización, también se proporciona una planta o material vegetal que ha sido colonizado con un inóculo de BVT Cr-7.

En una realización, la cepa BVT Cr-7 de *Clonostachys rosea* f. *rosea* es útil como agente de control biológico para el tratamiento de plantas. En una realización, se proporciona un método para el tratamiento de una planta que comprende poner en contacto la planta con la cepa BVT Cr-7 de *Clonostachys rosea* f. *rosea* como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en una realización, BVT Cr-7 es útil para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de la planta en relación con una planta de control que no ha sido tratada con BVT Cr-7. En una realización, BVT Cr-7 es útil para la prevención o tratamiento de enfermedades y/o patógenos en una planta. En una realización, BVT Cr-7 es útil para promover la exclusión de otros hongos, incluyendo hongos patógenos, de colonizar una planta. En una realización, BVT Cr-7 es útil para desencadenar resistencia natural a enfermedades y estrés en una planta, tal como en respuesta a una infección con un patógeno. También se proporciona un método para reducir el deterioro de un material vegetal que comprende poner en contacto el material vegetal con BVT Cr-7.

En una realización, BVT Cr-7 es útil para el tratamiento de una planta para prevenir o tratar enfermedades y/o patógenos que pueden afectar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de la planta. En una realización, el patógeno es un microorganismo, tal como un hongo o bacteria. Los ejemplos de patógenos que pueden afectar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de una planta que pueden ser controlados por BVT Cr-7 incluyen, entre otros, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp., *Alternaria*, *Monilia*, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Rhizoctonia*, *Streptomyces*, *Didymella* y/o *Fusarium*. Los ejemplos de enfermedades que pueden afectar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de una planta que puede controlarse mediante la aplicación BVT Cr-7 incluyen, entre otros, la enfermedad del moho gris, la enfermedad del moho blanco, la podredumbre parda y/o la podredumbre radicular. Otros ejemplos incluyen enfermedades por phomopsis, por ejemplo, en arándanos o uvas, y costra de la patata.

En una realización, la planta es cualquier planta o parte de la misma que puede ser colonizada endófiticamente por la cepa BVT Cr-7 de *Clonostachys rosea* f. *rosea*. En una realización, la planta es una planta con flores, cereales, leguminosas o vegetales. Por ejemplo, en una realización, los métodos y usos descritos aquí son útiles para el tratamiento de plantas tales como plantas con flores o cultivos tales como verduras, frutas, cereales, así como semillas o plántulas de los mismos. En una realización, los métodos y usos descritos en el presente documento son útiles para el tratamiento y las plántulas/trasplantes de árboles coníferos. En una realización, la planta es un árbol tal como el pino, el abeto negro o los trasplantes de pino. En una realización, la planta es trigo, cebada, girasol, canola, arándanos, fresas, frambuesas, uvas, patatas, pimientos, pepinos, tomates, pastos de grama, pimientos, tomates, pepinos, brócoli, coliflor, melocotones, manzana, canola, florales ornamentales como rosas, geranios, ciclamino, boca de dragón, Exacum, begonia o lirios. En una realización, la planta se cultiva al aire libre. En una realización, la planta se cultiva en un invernadero.

En una realización, los métodos y usos descritos en el presente documento comprenden poner en contacto la planta con BVT Cr-7, tal como un cultivo de BVT Cr-7, las esporas o su formulación. En una realización, el cultivo de BVT Cr-7, las esporas o su formulación son útiles como inoculantes. En algunas realizaciones, BVT Cr-7 se aplica a una planta o parte de la misma como una solución de aspersión, rocío, inmersión, polvo o nutrientes y/o mediante el transporte con insectos, como el uso de transporte con abejas como se describe en la solicitud PCT No. PCT/CA2013/050179.

También se proporcionan métodos para la producción de un agente de control biológico, comprendiendo el método inocular un sustrato con un cultivo aislado de BVT Cr-7 e incubar el sustrato en condiciones adecuadas para el crecimiento de hongos para producir la cepa BVT Cr-7 de *Clonostachys rosea* f. *rosea*. Opcionalmente, el método comprende además incubar el sustrato en condiciones adecuadas para la esporulación de hongos y eliminar las esporas del sustrato para producir un inóculo.

Otras características y ventajas de la presente divulgación se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos que aunque indican las formas de realización preferidas de la divulgación se ofrecen solo a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la divulgación serán evidentes para los expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

Descripción detallada
Definiciones

5 Como se usa en este documento, "cepa BVT Cr-7 de *Clonostachys rosea* f. *rosea*" o "BVT Cr-7" se refiere a la cepa de hongo depositada con el número de acceso 040913-01 en la Autoridad Internacional de Depósito de Canadá ubicada en el Laboratorio Nacional de Microbiología, Agencia de Salud Pública de Canadá, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canadá, el 4 de septiembre de 2013. Los términos "cepa BVT Cr-7 de *Clonostachys*
10 *rosea* f. *rosea*", "BVT Cr-7" o "cepa IDAC 040913-01 de *Clonostachys rosea* f. *rosea*" también incluyen aislados de dicha cepa o cualquier célula, cultivo, espora y progenie producida a partir de dicha cepa, tal como mediante reproducción asexual.

Se pueden usar diferentes métodos conocidos en la técnica para cultivar BVT Cr-7 o preparar esporas fúngicas, que incluyen pero no se limitan a los métodos descritos en este documento y en Sutton y col. "Gliocladium roseum: a versatile adversary of Botrytis cinerea in crops." Plant Dis 1997; 81: 316-28; Sutton y col. " Ability of *Clonostachys*
15 *rosea* to establish and suppress sporulation potential of Botrytis cinerea in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes" Biocontrol Sci Technol 2002; 12 (4): 413-25, y la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2012/0021906 "Fungal Inoculant Compositions".

20 Como se usa en el presente documento, "planta" se refiere a cualquier miembro del reino *Plantae* que puede ser colonizado endofíticamente por BVT Cr-7. En una realización preferida, la planta es una planta cultivada. En una realización, "planta" también incluye tubérculos, semillas y/o plántulas que dan lugar a una planta y, opcionalmente, incluye material vegetal. Como se usa en este documento, "material vegetal" se refiere a cualquier material que se recolecta o se separa de una planta y se destina al uso como alimento u otros usos que son susceptibles de deterioro
25 debido a enfermedades y/o infecciones por patógenos. Los ejemplos de material vegetal incluyen, pero no se limitan a, granos cosechados, frutos o vegetales.

Como se usa en el presente documento, "colonizado endofíticamente" se refiere al proceso por el cual las esporas de un hongo penetran y forman colonias de hongos dentro de una planta hospedadora, o parte de la misma, sin causar
30 síntomas u otros aspectos de la enfermedad, o bien dañando a la planta hospedadora.

Como se usa en el presente documento, "agente de control biológico" se refiere a un agente que promueve la salud, el crecimiento, el vigor y/o el rendimiento de las plantas; mejora las tasas de germinación y/o la calidad de la semilla; aumenta la resistencia a enfermedades, plagas y/o estrés ambiental tal como condiciones climáticas adversas o del
35 suelo; controla o actúa contra enfermedades o patógenos o es útil para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o patógeno; o promueve la recuperación de plantas de lesiones y/o infecciones. Un ejemplo preferido de un agente de control biológico es *Clonostachys rosea* BVT Cr-7 como se describe en este documento.

Como se usa en este documento, "patógeno" se refiere a un microorganismo que puede invadir y colonizar una planta huésped y reducir la salud, el crecimiento, el vigor y/o el rendimiento de la planta. Los ejemplos de patógenos incluyen, pero no se limitan a, bacterias y hongos tales como *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y especies de *Pythium*,
40 *Alternaria*, *Monilia*, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium Rhizoctonia*, *Streptomyces*, *Didymella* y/o *Fusarium*.

Interacción de *Clonostachys rosea* con plantas y organismos patógenos de plantas

45 Sin estar limitado por la teoría, se cree que *Clonostachys rosea* BVT Cr-7 confiere protección a las plantas a través de una variedad de mecanismos que incluyen la activación de la resistencia natural de las plantas a las enfermedades y el estrés, y mediante la exclusión competitiva de otros patógenos.

50 *Clonostachys* se reproduce por medio de un gran número de esporas microscópicas (5-7 µm) en forma de frijol. Cuando se aplican a las plantas, las esporas germinan para producir pequeños tubos a partir de los cuales se forman ramas extremadamente finas y penetran en los tejidos de las plantas. Las penetraciones pueden ocurrir en pétalos vivos, hojas, lesiones de las plantas, raíces, tubérculos y otras partes de plantas. Una vez dentro de los tejidos, cada rama forma una colonia microscópica de hongos. Las plantas con colonias de *Clonostachys* no muestran síntomas
55 como los producidos por organismos causantes de enfermedades (patógenos). Cuando se establece como un endófito dentro de los tejidos de la planta, el *Clonostachys* puede ejercer efectos beneficiosos, tales como desencadenar la resistencia natural de la planta a enfermedades y estrés.

60 La relación de las colonias microscópicas de *Clonostachys* con los tejidos de las plantas cambia bruscamente cuando los tejidos de las plantas comienzan a envejecer, como cuando una hoja comienza a volverse amarilla o cuando comienza a desarrollarse una enfermedad o estrés. En ese momento, las diminutas colonias comienzan a crecer rápidamente y, a menudo, ocupan completamente los tejidos vecinos. *Clonostachys* comienza este crecimiento antes de casi todos los otros hongos y bacterias que crecen en las plantas senescentes y moribundas. De este modo, *Clonostachys* es un colonizador pionero de los tejidos de plantas senescentes. En efecto, ocupa los tejidos por delante
65 de otros organismos, incluidos los patógenos destructivos, como la *Botrytis*, *Sclerotinia* y *Monilia*. Una vez que los tejidos están ocupados, otros organismos, como los patógenos, no desplazan al organismo ocupante. *Clonostachys*

es capaz de bloquear el crecimiento de patógenos y otros hongos simplemente mediante ocupación preventiva de estos tejidos. Esta exclusión competitiva es un medio principal por el cual *Clonostachys* suprime los organismos de enfermedad y el desarrollo de la enfermedad en plantas. Como se muestra en los ejemplos, *Clonostachys* BVT Cr-7 es particularmente eficaz en el control de enfermedades y patógenos en una amplia variedad de plantas.

Clonostachys produce esporas cuando los tejidos colonizados progresivamente senescen y mueren. En muchos casos, estas esporas inician nuevos ciclos de crecimiento endofítico en las plantas vivas cercanas. *Clonostachys* puede persistir por un tiempo en materiales de plantas muertas que colonizó mientras estaban vivas. Sin embargo, tiene poca capacidad para crecer en materiales vegetales muertos ya ocupados por otros hongos y bacterias. En este tipo de situaciones, *Clonostachys* no compiten bien con microbios como el *Penicillium* y *Aspergillus*, que se adaptan al mundo microbiano de los residuos y suelos de las plantas.

Clonostachys también tiene la capacidad de crecer en las hifas y micelios de otros hongos (es decir, es un micoparásito). *Clonostachys* usualmente ataca a otro hongo solo después de hacer un contacto muy cercano con las hifas, esclerocios u otra parte del hongo (es decir, contacto absoluto o a una distancia de quizás 1-5 µm). Al hacerlo, las hifas de *Clonostachys* a veces se enrollan alrededor del hongo que está siendo parasitado y el "hongo huésped" esencialmente muere.

Sin estar limitados por la teoría, se piensa que las formas principales por las cuales *Clonostachys* suprime patógenos y enfermedades en plantas son: A. ocupando rápidamente los tejidos senescentes o dañados para impedir el crecimiento de patógenos en los tejidos; y B. estimulando los mecanismos naturales de resistencia de las plantas a los organismos patógenos. Además, la *Clonostachys* puede desactivar o matar las estructuras de supervivencia de los hongos (como los esclerocios y varios tipos de esporas en o sobre los suelos) a través del parasitismo (es decir, crecer sobre ellos como fuentes de alimento). BVT Cr-7 es una cepa aislada de *Clonostachys* que presenta una serie de características que lo hacen particularmente eficaz como agente de control biológico para el tratamiento de plantas.

Propiedades y características de la cepa BVT Cr-7

En una realización, se proporciona una cepa aislada de *Clonostachys*, denominada BVT Cr-7. En una realización, la cepa es la depositada bajo el número de acceso 040913-01 en la Autoridad Internacional de Depósito de Canadá ubicada en el Laboratorio Nacional de Microbiología, Agencia de Salud Pública de Canadá, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canadá el 4 de septiembre de 2013. En una realización, "cepa BVT Cr-7 de *Clonostachys rosea* f. *rosea*" o "BVT Cr-7" incluye cualquier cultivo, esporas, células y progenie producida a partir de dicha cepa, tal como por reproducción asexual. Como se describe en el presente documento, BVT Cr-7 exhibe una serie de propiedades ventajosas sobre otras cepas de *Clonostachys*.

Por ejemplo, en una realización, BVT Cr-7 es capaz de producir esporas en medios de agar estándar y semillas de plantas tales como semillas de cereales esterilizadas. En una realización, BVT Cr-7 tiene una capacidad mejorada para producir esporas en medios de agar estándar y semillas de plantas tales como semillas de cereales esterilizadas en comparación con otras cepas de *Clonostachys rosea* f. *rosea*, tales como 88-710 (también conocida como AFR-710, PG -710). La cepa 88-710 se describe en Sutton y col., Evaluation of the Fungal Endophyte *Clonostachys rosea* as an Inoculant to Enhance Growth, Fitness and Productivity of Crop Plants. Proc. IVth IS on Seed, Transplant and Stand Establishment of Hort. Crops Ed.: D.I. Leskovar, Acta Hort. 782, ISHS 2008 páginas 279-286. En una realización, las semillas de cereal son semillas de trigo o cebada. En una realización, BVT Cr-7 es útil para la producción de un inoculante para uso en el tratamiento de plantas.

En un aspecto, BVT Cr-7 es capaz de establecerse endofíticamente en plantas. En una realización, BVT Cr-7 es capaz de establecerse endofíticamente en las raíces de las plantas, tales como las raíces de los cultivos de plantas. En una realización, BVT Cr-7 tiene una capacidad mejorada para establecerse endofíticamente en las raíces de las plantas en comparación con otras cepas de *Clonostachys rosea* f. *rosea*, como 88-710. Por ejemplo, en una realización, BVT Cr-7 tiene una capacidad mejorada para establecerse endofíticamente en cultivos de plantas y/o plantas tales como cereales de grano pequeño, pastos de grama, guisantes, canola, soja, pimientos, tomates y pepinos.

En una realización, BVT Cr-7 es capaz de establecerse endofíticamente en el follaje y/o las flores de las plantas. En una realización, BVT Cr-7 tiene una capacidad mejorada para establecerse endofíticamente en el follaje y las flores de las plantas en comparación con otras cepas de *Clonostachys rosea* f. *rosea*, como 88-710. Por ejemplo, en una realización, BVT Cr-7 tiene una capacidad mejorada para establecerse endofíticamente en el follaje y/o flores de mini rosas, fresas, girasoles y canola.

En otro aspecto, BVT Cr-7 es capaz de suprimir y/o controlar enfermedades en plantas. En una realización, BVT Cr-7 es capaz de suprimir y/o controlar enfermedades en plantas causadas por patógenos tales como otros hongos o microorganismos. En una realización, BVT Cr-7 tiene una capacidad mejorada para suprimir o controlar enfermedades en otras plantas en comparación con otras cepas de *Clonostachys rosea* f. *rosea*, como 88-710. Por ejemplo, en una realización, BVT Cr-7 tiene una capacidad mejorada para suprimir o controlar enfermedades que afectan el follaje, las flores, los frutos y/o las raíces de las plantas. En una realización, la enfermedad es causada por *Botrytis cinerea* (enfermedades del moho gris), *Sclerotinia sclerotiorum* (enfermedades del moho blanco) y/o por especies de *Pythium*

spp., *Rhizoctonia* y/o *Fusarium* (podridones de la raíz y otras enfermedades).

5 En una realización, BVT Cr-7 es capaz de reducir el deterioro de los materiales vegetales. Por ejemplo, en una realización, el contacto del material vegetal recolectado con BVT Cr-7, tal como por tratamiento por aspersión, reduce la incidencia de podredumbre en relación con el material vegetal no tratado.

Aplicación de BVT Cr-7 a plantas y/o partes de las mismas

10 En una realización, los métodos y usos descritos en este documento incluyen poner en contacto una planta o material vegetal con BVT Cr-7. En una realización, BVT Cr-7 se expone a plantas o material vegetal para estimular la colonización endofítica de la planta o material vegetal. BVT Cr-7 se puede aplicar a cualquier parte de una planta, incluido el follaje de las plantas, flores, raíces, tubérculos y/o semillas mediante cualquier método conocido, incluso mediante aspersiones, rocío, inmersión, soluciones nutritivas y/o transporte con insectos, dependiendo de la aplicación.

15 Por ejemplo, las plantas jóvenes para trasplante pueden tratarse empapando el medio del suelo o sumergiendo las plantas en el trasplante.

20 En otro ejemplo, las enfermedades causadas por patógenos que infectan flores a menudo se pueden controlar de manera efectiva mediante la aplicación de *Clonostachys rosea* BVT Cr-7 a las flores, como por ejemplo tratamientos con aspersión o transporte con insectos, como la tecnología de transporte con abejas como se describe en la publicación PCT No. WO2012/135940 y solicitud PCT No. PCT/CA2013/050179. En una realización, transporte con abejas permite el tratamiento de cultivos florales porque las abejas suministran *Clonostachys* a flores recién abiertas cada día (en contraste, por ejemplo, con las aspersiones semanales).

25 Otros ejemplos de aplicaciones incluyen la aplicación de *Clonostachys* al follaje de cultivos de invernadero mediante rocío con un volumen ultra bajo o aspersión convencional para controlar patógenos tales como la *Botrytis* en las hojas y en las lesiones del tallo producidas durante el deshoje y otras prácticas de poda; tratamientos mediante aspersión de pastos en campos de golf con *Clonostachys* para controlar la macha del dólar (*Sclerotinia*), mohos de nieve (*Typhula*, *Microdochium*) y otras enfermedades del follaje; la aplicación de *Clonostachys* a lesiones recientes (dentro de las 48 horas) a menudo brinda protección a largo plazo contra muchos organismos patógenos que infectan las lesiones, por ejemplo en injertos, esquejes y plantas lesionadas; y las semillas pueden tratarse con *Clonostachys* (seguido del crecimiento del hongo en los sistemas radiculares) para mejorar la capacidad de cultivos como los guisantes para sostener el crecimiento cuando están estresadas por la sequía o las prácticas de producción (incluido el uso de ciertos pesticidas).

35 En una realización, BVT Cr-7 como se describe en el presente documento puede ser útil para controlar patógenos tales como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Monilinia vaccinii-corymbosi* y/o *Botrytis cinerea* en varios cultivos, incluyendo canola, girasol, frambuesa, fresa, manzana, pera, kiwi, sandía, café, mango, aguacate, cereza, ciruela, almendra, melocotón, anacardo, guayaba, alfalfa, trigo sarraceno, frijol, arveja, soja, algodón, mostaza, mora, baya de ganso, pimienta, berenjena y grosella.

40 En algunas realizaciones, BVT Cr-7 se aplica a plantas como una exposición de dosis única o en dosis múltiples o exposiciones en diferentes momentos. Por ejemplo, en una realización, las plantas se dosifican o exponen a BVT Cr7, por ejemplo, mediante aspersión o transporte por insectos con una colmena de abejas equipada con un dispensador adecuado de inóculo al menos con un intervalo de 2 días, 4 días, 1 semana, 2 semanas, 1 mes o más de 1.

45 En una realización, las plantas se ponen en contacto con BVT Cr-7 una o más veces durante el ciclo de crecimiento anual de la planta objetivo. Por ejemplo, en una realización, BVT Cr-7 se aplica a las plantas en la primavera al comienzo de la temporada de crecimiento y/o en el otoño al final de la temporada de crecimiento. En una realización, BVT Cr-7 se aplica a las plantas antes de la cosecha de materiales vegetales, tal como 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas antes de la cosecha de materiales vegetales.

Formulaciones para inocular plantas

55 En un aspecto, se proporciona una formulación que comprende BVT Cr-7 que es adecuada para inocular plantas o materiales vegetales. Opcionalmente, la formulación puede ser un sólido tal como una formulación en polvo, o una solución tal como una solución acuosa. En una realización, la formulación comprende esporas liofilizadas de BVT Cr-7. En una realización, las formulaciones descritas en el presente documento son útiles como inoculante para el tratamiento de plantas.

En una realización, la formulación puede incluir diversos aditivos combinados con un cultivo aislado o esporas fúngicas derivadas de la cepa BVT Cr-7 de *Clonostachys rosea* f. *rosea*.

65 Una persona experta apreciará que la concentración de células o esporas en la formulación puede variar dependiendo de las condiciones en las que se va a usar la formulación (por ejemplo, clima, planta objetivo, método de aplicación

de la formulación a las plantas o materiales vegetales etc.).

En algunas realizaciones, la formulación es una formulación sólida y puede comprender entre aproximadamente 1×10^8 y aproximadamente 4×10^8 esporas por gramo de formulación, opcionalmente entre aproximadamente 2×10^8 y aproximadamente 4×10^8 esporas por gramo de formulación.

En algunas realizaciones, los aditivos incluyen uno o más de un agente estabilizante, un agente de absorción de humedad, un agente atrayente, un diluyente y/o un agente antiaglomerante. En algunas realizaciones, los aditivos pueden incluir dos o más de un agente estabilizante, un agente de absorción de humedad, un agente atrayente, un diluyente y/o un agente antiaglomerante. En una realización, la formulación es adecuada para el transporte con insectos, tal como la descrita en el documento PCT/CA2013/050179.

En una realización, la formulación incluye un agente estabilizante. El agente estabilizante sirve para prevenir o minimizar el decaimiento, la descomposición o la activación de la espora del hongo antes del suministro al objetivo de la planta. Los ejemplos de agentes estabilizantes incluyen silicato de calcio en partículas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la formulación puede comprender una espora fúngica, y la espora fúngica puede estar unida a al menos algo del silicato de calcio. La formulación puede tener una densidad de entre aproximadamente 1×10^9 y 4×10^9 esporas por gramo de silicato de calcio al que está unida. En una realización, la formulación puede tener aproximadamente 2×10^9 esporas por gramo de silicato de calcio al que está unida.

En una realización, la formulación incluye un agente de absorción de humedad. El agente de absorción de humedad sirve para absorber la humedad de la formulación con el fin de mantener la formulación relativamente seca y para evitar el apelmazamiento o la acumulación de la formulación. Los ejemplos de agentes hidratantes incluyen desecantes, tales como partículas o perlas de gel de sílice, y polímeros superabsorbentes, tales como poliacrilato de sodio. Otros ejemplos de agentes de absorción de humedad incluyen virutas de madera y bolas de arcilla.

En una realización, la formulación incluye un agente atrayente. El agente atrayente puede ayudar a atraer la formulación a las plantas y/o insectos transportadores. Por ejemplo, el agente atrayente puede tener una carga electrostática neta positiva, por lo que es atraído electrostáticamente a las plantas y/o insectos transportadores, que tienen una carga electrostática negativa neta. En algunos ejemplos, el agente atrayente puede incluir un mineral o una mezcla de minerales. En un ejemplo particular, el agente atrayente puede incluir una mezcla mineral vendida por Agri-Dynamics (Martins Creek, PA) bajo el nombre DYNA-MIN^{MR}, que incluye los siguientes minerales: dióxido de silicio, óxido de aluminio, calcio, hierro, magnesio, potasio, sodio, fósforo, titanio, manganeso, estroncio, circonio, litio, rubidio, boro, zinc, vanadio, cromo, cobre, itrio, níquel, cobalto, galio, cesio, escandio, estaño, molibdeno y otros oligoelementos. En otro ejemplo, el agente atrayente puede incluir piedra caliza de calcio.

En una realización, la formulación incluye un diluyente. El diluyente puede ser un almidón o harina adecuado. En los ejemplos en los que la formulación debe administrarse por transporte con insectos, el diluyente puede seleccionarse de manera que no irrite o dañe a los insectos, y no será comido por los insectos. El diluyente puede seleccionarse adicionalmente de modo que no absorba cantidades significativas de humedad, de modo que el diluyente no se acumule. Los ejemplos de diluyentes que pueden ser adecuados para el transporte con insectos incluyen harina de maíz y harinas de grano tales como centeno, trigo, harina de arroz y harina de espelta. En ejemplos alternativos, el diluyente puede ser caolín. En otros ejemplos, el diluyente puede comprender leche en polvo o talco. Estos pueden ser particularmente útiles en ejemplos en los que la formulación se administra de una manera diferente a aquella de transporte con insectos, tal como por aspersión.

En una realización, la formulación incluye un agente antiaglomerante adecuado. Un ejemplo particular de un agente antiaglomerante es el óxido de magnesio. Otros agentes antiaglomerantes conocidos por los expertos en la técnica también pueden emplearse en las formulaciones descritas en el presente documento.

En una realización, la formulación es una formulación líquida, tal como una suspensión acuosa. En una realización, la formulación comprende aproximadamente 1 a 6×10^5 esporas/mL y opcionalmente aproximadamente 2 a 5×10^5 esporas/mL. En una realización, la formulación es una formulación líquida y comprende uno o más vehículos o diluyentes adecuados desde el punto de vista agrícola. En una realización, la formulación líquida comprende uno o más agentes estabilizantes.

También se proporcionan métodos para la producción de un agente de control biológico como se describe en el presente documento, tal como un inoculante que comprende una cantidad eficaz de BVT Cr-7. Por ejemplo, en una realización se proporciona un método que comprende proporcionar un cultivo aislado de BVT Cr-7; inoculando un sustrato con el cultivo aislado de BVT Cr-7 e incubando el sustrato en condiciones adecuadas para el crecimiento de hongos. En una realización, el sustrato inoculado se incubaba a una humedad relativa mayor que 90% o mayor que 95% y a una temperatura en el intervalo de 20-24 grados Celsius.

En una realización, el sustrato es un sustrato estéril. En una realización, el método comprende además incubar el sustrato en condiciones adecuadas para la esporulación de hongos. Las condiciones adecuadas para la esporulación de hongos de *Clonostachys rosea* son conocidas en la técnica. Por ejemplo, en una realización, las condiciones

adecuadas para la esporulación de hongos incluyen el cultivo de BVT Cr-7 en un sustrato como semillas esterilizadas a aproximadamente 20-24 grados centígrados a altos niveles de humedad (superior a aproximadamente el 95%) durante unos pocos días para permitir el crecimiento del hongo antes de reducir la humedad relativa a menos del 50%, opcionalmente aproximadamente del 20 al 50%, del 35 al 45% o aproximadamente del 20 al 25% durante al menos 10 días, al menos 2 semanas o más de 2 Semanas para favorecer la abundante producción de esporas. Los inventores han determinado que la reducción del nivel de humedad relativa hasta aproximadamente 35-45% durante al menos aproximadamente 2 semanas es particularmente efectiva para la producción de esporas de hongos de BVT Cr7. En una realización, las semillas esterilizadas son semillas de cebada. En una realización, el sustrato se airea a lo largo de toda la producción de esporas. Preferiblemente, el sustrato se incuba en condiciones estériles para evitar la contaminación con otros microbios.

En una realización, el método comprende además eliminar las esporas del sustrato, opcionalmente mediante suspensión en una solución acuosa. En una realización, las esporas se eliminan del sustrato para producir un inóculo. Opcionalmente, las esporas se pueden eliminar del sustrato y luego se pueden liofilizar o procesar de otra manera como se conoce en la técnica para producir un agente de control biológico. En una realización, el método comprende mezclar el inóculo con uno o más ingredientes adicionales tales como un agente estabilizante, un agente de absorción de humedad, un agente atrayente, un diluyente y/o un agente antiaglomerante para producir una formulación como se describe en el presente documento. En una realización, el método comprende eliminar las esporas del sustrato mediante la mezcla del sustrato con agua estéril. En una realización, el método comprende agitar la mezcla, filtrar los materiales agrupados o del proceso, centrifugar suavemente el filtrado y resuspender el material granulado para producir una solución acuosa.

Realizaciones adicionales

En una realización, se proporciona un método para controlar patógenos de plantas que comprende administrar BVT Cr-7 como se describe en este documento a una planta o material vegetal. Por ejemplo, los aislados, las esporas y las formulaciones de BVT Cr-7, como se describe en el presente documento, se pueden usar como un agente profiláctico para disminuir la posibilidad de que ocurra una infección en plantas o material vegetal, particularmente una infección por un hongo patógeno tal como *Botrytis* o *Sclerotinia*.

También se proporciona un método para controlar patógenos en plantas, comprendiendo el método tratar un lote de semillas con los cultivos o formulaciones descritas en este documento y luego cultivar las semillas tratadas en plantas.

También se proporciona una formulación que comprende BVT Cr-7 como se describe en el presente documento y un vehículo o diluyente, y que opcionalmente comprende además un agente de biocontrol adicional, tal como un agente antifúngico o pesticida. La formulación puede ser una formulación para el tratamiento de semillas, una formulación para el tratamiento de plantas o una formulación para el tratamiento del suelo. En una realización, el vehículo o diluyente es un vehículo o diluyente agrícola aceptable que ayuda a garantizar la estabilidad y el rendimiento de la formulación. En una realización, el vehículo o diluyente es compatible con el agente de control biológico, aceptable en agricultura y tiene una buena capacidad de absorción y una densidad aparente adecuada, permitiendo una fácil dispersión y unión de partículas.

Las formulaciones descritas en este documento que contienen BVT Cr-7 pueden, por ejemplo, ser aplicadas a las semillas o propágulos de las plantas, al medio de crecimiento (por ejemplo, suelo o agua), a las raíces de las plantas y/o al follaje. De las plantas, a las flores o pistilos de las plantas, o a cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos plantas que pueden tratarse con las presentes formulaciones incluyen, entre otras, cultivos agrícolas tales como cultivos de semillas, cultivos de granos, cultivos de fibra, cultivos de pulso, cultivos hortícolas, cultivos forestales y pastos de grama.

Las formulaciones que comprenden BVT Cr-7 descritas en el presente documento pueden aplicarse a una planta en aspersiones acuosas, gránulos y formulaciones de polvo fino/polvo de acuerdo con la práctica establecida en la técnica. Una aspersión acuosa generalmente se prepara mezclando un polvo humectable o una formulación concentrada emulsionable de un cultivo aislado o esporas de BVT Cr-7 con una cantidad relativamente grande de agua para formar una dispersión.

La divulgación anterior describe en general la presente solicitud. Se puede obtener una comprensión más completa por referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la divulgación. Los cambios en la forma y la sustitución de equivalentes se contemplan como circunstancias que podrían sugerirse o hacerse expeditas. Aunque se han empleado los términos específicos en el presente documento, dichos términos tienen un sentido descriptivo y no con fines de limitación.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente divulgación:

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento de la cepa BVT Cr-7 de *Clonostachys rosea f. rosea*

Se recolectaron varios tipos de plantas de cultivo (trigo, soja, maíz, alfalfa, pastos) en campos cerca de Guelph, Ontario, como posibles fuentes de nuevas cepas de *Clonostachys roseum* f. *roseum*. La cepa del hongo descrito en este documento como BVT Cr-7 se aisló de una raíz de una planta de trigo joven y saludable (etapa de maduración temprana) tomada de un campo cerca de Arkell, Ontario. Una serie de otras cepas de *Clonostachys rosea* f. *rosea* (BVT Cr-1 hasta BVT Cr-14) también se aislaron como se describe a continuación.

El procedimiento usado para aislar cepas de *Clonostachys* de las raíces de las plantas de trigo y otros cultivos fue el siguiente. Se emplearon técnicas asépticas a lo largo del proceso. Las raíces de varias plantas se lavaron en agua del grifo para eliminar la suciedad, se secaron sobre toallas de papel y luego se cortaron en segmentos de 1 a 2 cm de largo. Los segmentos se secaron con papel de seda y se incubaron en medio de agar paraquat-cloranfenicol en placas de Petri a 20-22°C. El paraquat acelera la senescencia de la raíz, lo que permite la esporulación de *Clonostachys* con relativa rapidez (por ejemplo, dentro de los 6 a 8 días) en las superficies de las raíces que había colonizado previamente. Las estructuras de esporulación (conidióforos y conidios que portan) son la base para que el hongo sea reconocido e identificado. Los conidios (es decir, las esporas) se pueden remover y germinar en cultivo.

Para aislar el hongo, las esporas se transfirieron con una aguja estéril desde los conidióforos en las raíces hasta el medio de agar de dextrosa de patata (PDA) modificado con estreptomycin (para suprimir las bacterias) en placas de Petri. Después de que las esporas hubieran germinado y producido colonias en el medio de agar, el hongo se subcultivó sobre PDA-estreptomycin en placas de Petri. Las esporas de los subcultivos se suspendieron en agua destilada estéril, y las suspensiones se diluyeron en serie y se extendieron sobre PDA. Las colonias que crecían a partir de esporas individuales se transfirieron a medio de agar fresco en placas de Petri y se mantuvieron en cultivo a 4°C como una serie de aislados para una caracterización adicional como posibles agentes de control biológico.

Las series de cepas aisladas se probaron y compararon entre sí y con las cepas establecidas de *Clonostachys rosea* f. *rosea*, incluidas 88-710 y EV-1a. La cepa 88-710 se describe en Sutton y col., Evaluation of the Fungal Endophyte *Clonostachys rosea* as an Inoculant to Enhance Growth, Fitness and Productivity of Crop Plants. Proc. IVth IS on Seed, Transplant and Stand Establishment of Hort. Crops Ed.: D.I. Leskovar, Acta Hort. 782, ISHS 2008 páginas 279-286.

La cepa aislada de BVT Cr-7 [Bee-Vectoring Technology *Clonostachys rosea* # 7] se identificó como un aislamiento superior a través de la experimentación como se establece en los Ejemplos 2 y 3. Los cultivos aislados de BVT Cr-7 se mantuvieron y se depositaron bajo Número de acceso 040913-01 en la Autoridad Internacional de Depósito de Canadá ubicada en el Laboratorio Nacional de Microbiología, Agencia de Salud Pública de Canadá, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canadá el 4 de septiembre de 2013.

Ejemplo 2: Prueba y caracterización de BVT Cr-7 en relación con otras cepas de *Clonostachys rosea* f. *rosea*

La cepa recién aislada BVT Cr-7 y dos cepas adicionales de *Clonostachys rosea* f. *rosea* (88-710 y EV-1a) se compararon en una serie de experimentos diseñados para evaluar sus propiedades como agentes de control biológico para el tratamiento de plantas. Se observó que BVT Cr-7 es equivalente o superior en comparación con 88-710 y/o EV-1a según cada uno de los siguientes criterios:

- Crecimiento y abundancia de la producción de esporas en medios de agar estándar y en sustratos como semillas de cereales esterilizadas (trigo y cebada) que se pueden usar para la producción de inóculos comerciales.
- Capacidad para establecer abundantemente dentro de las raíces (es decir, endofíticamente) de diversos tipos de plantas de cultivo, que incluyen cereales de grano pequeño, césped, guisantes, canola, soja, pimientos, tomates y pepinos.
- Capacidad para establecer endofíticamente en el follaje y las flores de varias plantas de prueba (mini rosas, fresas, girasoles, canola).
- Habilidad para suprimir o controlar un amplio espectro de enfermedades destructivas que afectan el follaje, las flores, los frutos y las raíces, especialmente las causadas por *Botrytis cinerea* (enfermedades del moho gris), *Sclerotinia sclerotiorum* (enfermedades del moho blanco) y por especies de *Pythium* spp., *Rhizoctonia*, y *Fusarium* (pudriciones de raíz y otras enfermedades).

La BVT Cr-7, por lo tanto, exhibe un perfil de desempeño deseado contra diversas enfermedades en diversos tipos de cultivos y en general exhibe preferiblemente actividad como agente de control biológico en comparación con 88-710 y/o EV-1a.

Ejemplo 3: Rendimiento de BVT Cr-7 para el control de enfermedades en plantas

Se aplicó BVT Cr-7 a una serie de plantas y cultivos para evaluar su actividad en ensayos de campo. En particular, BVT Cr-7 se aplicó a las flores de las siguientes plantas (por ejemplo, mediante transporte con abejas o tratamientos de rociado) para controlar las enfermedades causadas por los patógenos particulares:

- GIRASOLES: *Sclerotinia*, *Botrytis*, y *Fusarium*

- CANOLA: *Sclerotinia*
- ARÁNDANOS: *Monilinia*, *Sclerotinia*, *Botrytis* y *Phomopsis*
- FRESAS: *Botrytis*, *Phomopsis*, y *Rhizopus*
- FRAMBUESAS: *Botrytis*
- UVAS: *Botrytis*, *Phomopsis*

5

La BVT Cr-7 también se aplicó a las raíces de cultivos hidropónicos de invernadero (a través de una solución nutritiva) y se observó que controlaba las enfermedades causadas por *Pythium* y *Fusarium* en pimientos pepinos y tomates.

10 Se aplicó BVT Cr-7 al follaje (como una aspersión) de pastos de grama, pimientos de invernadero y tomates de invernadero. Se observó que BVT Cr-7 controlaba las enfermedades causadas por *Sclerotinia*, *Typhula* y *Microdochium* en pastos de grama, *Fusarium* en pimientos de invernadero y *Botrytis* en tomates de invernadero.

Prueba de campo de BVT Cr-7 para el tratamiento de fresas

15

Se llevó a cabo un ensayo en Ontario en el que cuatro colonias de abejorros se colocaron en el centro de un campo de fresas orgánicas de cuatro acres. Cada caja de colonias ("colmena") estaba equipada con un dispensador para espolvorear a las abejas con una formulación en polvo de BVT Cr-7 cuando salían de las colmenas. BVT Cr-7 se recuperó de más del 80% de las flores de fresa en todo el campo. Los niveles de pudrición de la fruta en el campo con transporte con abejas de BVT Cr-7 fueron extraordinariamente bajos en comparación con un campo de fresa orgánica cercano que no se trató. En este ensayo, BVT Cr-7 suprimió la podredumbre de las bayas de *Botrytis* en más de un 90%, la pudrición de las bayas de *Phomopsis* en un 100% y la podredumbre de *Rhizopus* ("filtración") en un 93%.

20

Prueba de campo de BVT Cr-7 para el tratamiento de los girasoles

25

Se realizó una prueba con transportadores de campo de BVT Cr-7 mediante abejorros en girasoles cerca de Ripley Ontario. Las semillas cosechadas del campo tratado y de un campo de control en el área (sin abejorros o BVT Cr-7) se compararon en ensayos de laboratorio. La germinación de las semillas del tratamiento mediante transporte con abejas fue un 27% mayor que en las semillas de control (es decir, un 89,7% en comparación con un 70,7%). El tratamiento con BVT Cr-7 también redujo el nivel de varios mohos indeseables en las semillas (*Fusarium*, *Botrytis* y *Penicillium*).

30

Abejorros transportaron fuertemente BVT Cr-7 al menos 360 m desde las colmenas hasta las flores. BVT Cr-7 se estableció efectivamente como un endófito en grandes proporciones de los flósculos y semillas de las cabezas de girasol. El patógeno destructivo *Sclerotinia* no se encontró en cabezas de girasol colonizadas por BVT Cr-7, pero estuvo presente en 20-25% de cabezas fuera del rango de BVT Cr-7 transportado por abejas. Los cultivadores informaron que los rendimientos de las semillas aumentaron más del 20% (influencia de la polinización más BVT Cr-7) y de mejor calidad, especialmente mayor tamaño de las semillas (y, por lo tanto, más aceite) y reducciones de mohos en las semillas cosechadas.

35

40

Prueba de campo de BVT Cr-7 para el tratamiento de arándanos

Los ensayos en la Isla del Príncipe Eduardo demostraron que BVT Cr-7 aplicado por abejorros como una formulación en polvo o como aspersiones de suspensiones de esporas en agua puede establecerse endofíticamente en las flores, bayas y follaje de arándanos de bajo arbusto. Los tratamientos aumentaron la proporción de bayas sanas en un 70-100%. BVT Cr-7 redujo en gran medida la incidencia de la baya de la momia, una importante enfermedad causada por el hongo *Monilinia vaccinii-corymbosi*, incluso cuando las condiciones climáticas eran extremadamente favorables para la enfermedad. BVT Cr-7 también redujo notablemente el pardeamiento y la caída prematura de las bayas, lo que se consideró que se debía a una enfermedad hasta ahora no descrita y causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. En un año del ensayo la enfermedad por *Sclerotinia* fue al menos tan nociva como la baya de la momia en arándanos no tratados. Las aplicaciones de aspersión de BVT Cr-7 en el momento oportuno fueron efectivas contra la úlcera por *Phomopsis* en arándanos de arbusto bajo y en un ensayo en arándanos de arbusto alto en Ontario. Por lo tanto, BVT Cr-7 es una herramienta de control biológico de amplio espectro contra las principales enfermedades que afectan a los arándanos en el campo.

45

50

55

La cepa BVT Cr-7 de *Clonostachys rosea* f. *rosea* es por lo tanto capaz de controlar un amplio espectro de enfermedades de gran importancia económica en numerosos tipos de cultivos.

Ejemplo 4: Rendimiento de BVT Cr-7 en condiciones controladas

60

Se probó BVT Cr-7 en varios cultivos específicos para evaluar su uso como agente de control biológico:

A. SEMILLAS DE CANOLA: El tratamiento de semillas con BVT Cr-7 produjo una supresión muy fuerte de una cepa altamente agresiva de *Rhizoctonia solani* en un suelo esterilizado y de podredumbre de la raíz por *Pythium* en un suelo de campo.

65

B. ZANAHORIAS COSECHADAS (RAÍCES): BVT Cr-7 suprimió en gran medida la podredumbre por *Sclerotinia* cuando se inoculó conjuntamente con el patógeno en zanahorias en almacenamiento simulado.

5 C. Cabezas de BROCCOLI: El tratamiento por aspersión con BVT Cr-7 controló, *Alternaria*, *Cladosporium* y decoloración prematura de las cabezas de brócoli almacenadas.

D. DURAZNOS: la aplicación de BVT Cr-7 mediante rocío a duraznos frescos suprimió significativamente la incidencia y la tasa de desarrollo de la podredumbre parda (*Monilia*) en la fruta.

10 E. MISCANTHUS: La inmersión de los rizomas de Miscanthus en una suspensión de esporas de BVT Cr-7 antes del almacenamiento proporcionó protección contra pudriciones debidas a *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* durante varios meses de almacenamiento en frío.

15 Con base en estos resultados, BVT Cr-7 ha demostrado resistencia a enfermedades de alto rendimiento más amplia y probada en diversas condiciones en más tipos de cultivos que otras cepas de *C. rosea* f. *rosea*.

Ejemplo 5: Tratamiento de tomates de invernadero usando BVT Cr-7

20 Se evaluaron las flores de tomate de invernadero tratadas con *Clonostachys rosea* BVT-Cr7 y flores de control no tratadas para *Clonostachys rosea*, *Botrytis cinerea* y mohos comunes.

25 *C. rosea* BVT Cr-7 se administró a las plantas utilizando transporte con abejas equipando una caja de colonias (colmena de abejorros) con un dispensador de inóculo para entregar el inóculo a flores de tomates en un invernadero comercial relativamente pequeño (menos de un cuarto de acre) en un sitio de prueba en Nueva Escocia, Canadá.

Procedimientos de laboratorio

30 Se recibieron muestras de flores de tomate en excelentes condiciones del sitio de prueba. Cada muestra comprendía cuatro flores en una pequeña bolsa de plástico. Las cuatro flores de cada muestra se colocaron en medio de agar con paraquat-cloranfenicol (PCA) en placas de Petri el 20 de junio de 2014 y se incubaron en cajas de plástico transparente a 21-25°C a la luz del día durante 7 días. Cada flor se evaluó microscópicamente para *Clonostachys rosea*, *Botrytis cinerea* y mohos comunes. El paraquat acelera la senescencia natural de los tejidos de las plantas y, por lo tanto, permite que *Clonostachys rosea* produzca esporas y, por lo tanto, se identifique. Otros hongos también pueden crecer y esporularse en los tejidos a medida que envejecen y mueren.

Resultados

40 Como se muestra en la Tabla 1, la esporulación del agente de control biológico *Clonostachys rosea* BVT Cr-7 se observó en el 87,5% de las flores tratadas y 0% de las flores no tratadas. La esporulación de f. *rosea* en racimos de estambres más pistilos de flores tratadas fue más densa y extensa en casi todos los casos, de modo que la forma de cono de estos racimos parecía casi completamente blanca. La esporulación en los pétalos de la mayoría de las flores tratadas fue de moderada a fuerte.

45 La esporulación del patógeno *Botrytis cinerea* se encontró en el 12% de las flores no tratadas (y fue ligera en todos los casos) y en el 0% de las flores tratadas con *C. rosea*.

50 Se observaron mohos comunes de invernadero en diferentes grados en las muestras. Principalmente, estos incluyen especies de *Cladosporium* (no *Fulvia fulvum*), *Aspergillus* y *Penicillium*, *Alternaria alternata* y un hongo que se parece a *Acremonium*. Para proporcionar información cuantitativa sobre los efectos de *C. rosea* en estos mohos, cada flor se evaluó para "Mohos" (es decir, cualquier otro hongo que no fuera *C. rosea* o *Botrytis*) en una escala de 1 a 5 presentada en la Tabla 1, donde 1 representa cero rastros de moho y 5 representa mucho moho. Las áreas de las flores con esporulación de estos mohos fueron muy bajas (calificación promedio 1,80/5,00) en flores en las que se estableció *C. rosea* y esporulación pero alta (4,55/5,00) en ausencia de *C. rosea* (incluidas todas las flores de los controles). Por lo tanto, se observó que el agente de control biológico BVT Cr-7 suprimía notablemente estos mohos además de *Botrytis*. Esencialmente, las flores plateadas del tratamiento con *C. rosea* parecían muy "limpias" en comparación con las flores no tratadas.

Tabla 1: Resultados de los ensayos de BVT Cr-7 dispersados utilizando transporte con abejas en un invernadero.

60 *La escala para el área de flores plateadas cubiertas con uno o más de estos mohos fue: 1 = cero rastro; 2, ligero; 3, moderadamente ligero; 4, moderadamente fuerte; 5, muy fuerte.

Muestra No.	Flores tratadas con BVT-Cr7			Flores de control sin tratamiento		
	BVT-Cr7+ de 4	Clasificación del moho*	Total	Clasificación del moho*	Total	<i>B. cinerea</i>
1	4	1, 1, 1, 1	4	5, 5, 5, 5	20	

ES 2 714 873 T3

2	3	1, 1, 1, 3	6	3, 5, 5, 5	18	
3	4	1, 1, 1, 1	4	5, 5, 4, 4	18	++
4	4	3, 2, 1, 1	7	5, 5, 5, 4	19	
5	3	1, 1, 3, 2	7	5, 5, 5, 5	20	+
6	4	1, 1, 4, 1	7	5, 5, 5, 5	20	
7	2	4, 3, 1, 2	10	5, 4, 5, 4	18	
8	4	1, 2, 1, 4	8	3, 5, 5, 4	17	
9	4	1, 4, 2, 2	9	5, 5, 5, 5	20	
10	3	3, 1, 1, 2	7	2, 5, 5, 5	17	+
11	3	5, 1, 1, 1	8	5, 5, 5, 5	20	
12	4	2, 3, 2, 4	11	5, 3, 5, 5	18	+
13	3	1, 1, 4, 1	7	5, 5, 5, 5	20	+
14	4	1, 3, 1, 1	6	5, 5, 5, 5	20	+
49/56 = 87,5%		Total 101		Total 255		7
Clasificación media por flor 1,80						4,55

De manera notable, el uso de la abeja como medio de transporte para administrar el inóculo BVT-Cr7 permitió un rápido y completo establecimiento endofítico del agente de control biológico en las flores, según los notables niveles de esporulación observados después de que las flores se hubieran incubado durante una semana en PCA.

5 Se observó un excelente establecimiento de *C. rosea* en agrupaciones de "estambres más pistilo" y es de particular importancia dado que estos son los principales portales de entrada de patógenos.

10 Se observó la supresión completa aparente de *B. cinerea* y una gran supresión de diversos mohos de invernadero en flores colonizadas por *C. rosea*, lo que indica la posibilidades y actividad de amplio espectro del BVT Cr-7 contra otros hongos (tales como mediante exclusión competitiva).

Autoridad Internacional de Depósito de Canadá

Laboratorio Nacional de Microbiología, Agencia de Salud Pública de Canadá
 1015 Arlington Street
 Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2

Tel: (204) 789-6030
 Fax: (204) 789-2018

5

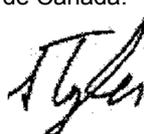
Formulario Internacional IDAC/BP/4

10

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL

(Emitido de conformidad con la Regla 7.1 de las Regulaciones del Tratado de Budapest)

ADJUNTAR COPIAS DEL CONTRATO DE DEPÓSITO ORIGINAL Y DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

I. Depositante	
Nombre: BVT Inc. Dirección: 48 William Street East, Caledon, ONL7K 1N7	
II. Identificación del Depositante	
Referencia de identificación dada por el depositante: BVT Cr-7	Número de acceso asignado por la Autoridad Internacional de Depósito: 040913-01
III. Descripción Científica y/o Designación Taxonómica Propuesta	
El depósito identificado bajo el numeral II anterior estaba acompañado por: <input checked="" type="checkbox"/> una descripción científica <input checked="" type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta (marque con una cruz donde corresponda)	
IV. Recibo y Aceptación	
Esta Autoridad Internacional de Depósito acepta el depósito identificado bajo el numeral II anterior, que se recibió el 4 de septiembre de 2013 (Fecha del depósito original).	
V. Autoridad Internacional de Depósito de Canadá:	
Firma(s) de la persona(s) que tienen el poder para representar a la Autoridad Internacional de Depósito de Canadá: 	Fecha: 9 de Septiembre de 2013

Recibo en el Caso de un Depósito Original 1/1

Archivo # 162 (13)

15

Autoridad Internacional de Depósito de Canadá
 Laboratorio Nacional de Microbiología, Agencia de Salud Pública de Canadá
 1015 Arlington Street
 Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2

Tel: (204) 789-6030
 Fax: (204) 789-2018

Formulario Internacional IDAC/BP/9

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

(Emitido de conformidad con la Regla 10.2 de las Regulaciones del Tratado de Budapest)

I. Interesado a quién se emite esta Declaración de Viabilidad	
Nombre: Michael Collinson BVT Inc.	Dirección: 48 William Street East Caledon, ON L7K 1N7
II. Depositante	III. Identificación del Depósito
Nombre: BVT Inc. Dirección: 48 William Street East Caledon, ON L7K 1N7	Número de acceso asignado por IDAC: 040913-01 Fecha del depósito o de la transferencia ¹ : 4 de septiembre de 2013
IV. Declaración de Viabilidad	
La viabilidad del depósito identificado anteriormente se probó el (fecha de la prueba más reciente): 16 de Septiembre de 2013	
En esa fecha, el depósito era	
<input checked="" type="checkbox"/> Viable <input type="checkbox"/> Ya no era viable	
V. Condiciones Bajo las Cuales la Prueba de Viabilidad ha Sido Realizada²	
VI. Autoridad Internacional de Depósito de Canadá:	
Firma(s) de la persona(s) que tienen el poder para representar a la Autoridad Internacional de Depósito de Canadá: 	Fecha: 16 de Septiembre de 2013

¹ Indica la fecha del depósito original o, cuando se ha hecho un nuevo depósito o transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia)

² Para ser llenado en la información que ha sido solicitada y si los resultados de la prueba son negativos.

REIVINDICACIONES

1. Un cultivo aislado de *Clonostachys rosea* f. *rosea*, en el que el cultivo aislado es una cepa IDAC 040913-01 de *Clonostachys rosea* f. *rosea*.
- 5 2. Una espora de hongo obtenida del cultivo aislado de *Clonostachys rosea* f. *rosea* de la reivindicación 1.
3. Una formulación que comprende el cultivo aislado de la reivindicación 1 o la espora de hongo de acuerdo con la reivindicación 2 y un vehículo o diluyente.
- 10 4. La formulación de la reivindicación 3, en la que la formulación está en forma líquida o en forma sólida.
5. La formulación de la reivindicación 3 o 4, en la que la formulación comprende entre aproximadamente 1×10^8 y 4×10^8 esporas por gramo de formulación, opcionalmente entre aproximadamente 2×10^8 y 4×10^8 esporas por gramo de formulación.
- 15 6. Un método para tratar una planta con un agente de control biológico que comprende poner en contacto la planta con el cultivo aislado, la espora de hongo o la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20 7. El método de la reivindicación 6, para:
- a) mejorar la salud, crecimiento y/o rendimiento de la planta;
 b) para la prevención o tratamiento de enfermedades y/o patógenos en la planta;
 c) para controlar el crecimiento de moho en la planta; o
 d) para mejorar la germinación de semillas de plantas.
- 25 8. El método de la reivindicación 7, en el que el patógeno es *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp., *Alternaria*, *Monilia*, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium Rhizoctonia*, *Streptomyces*, *Didymella* y/o *Fusarium* o en el que la enfermedad es la enfermedad por moho gris, la enfermedad por moho blanco, podredumbre parda, podredumbre de la raíz y/o phomopsis.
- 30 9. El método de la reivindicación 7 u 8, en el que la planta se selecciona de girasoles, canola, arándanos, fresas, uvas, pimientos, pepinos, tomates, pastos de grama, tomates, brócoli, duraznos, plántulas de canola y/o miscanthus.
- 35 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que poner en contacto la planta con el cultivo aislado, la espora de hongo o la formulación comprende aplicar una aspersion, rocío, una inmersión o una solución nutritiva a la planta.
- 40 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que poner en contacto la planta con el cultivo aislado, la espora de hongo o la formulación comprende el transporte con insectos.
12. Uso del cultivo aislado, espora de hongo o formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 como agente de control biológico.
- 45 13. Un método para reducir el deterioro del material vegetal, comprendiendo el método poner en contacto el material vegetal con el cultivo aislado, la espora de hongo o la formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, opcionalmente en el que se ha cosechado el material vegetal.
- 50 14. Un método para la producción de un agente de control biológico, comprendiendo el método:
- inocular un sustrato con el cultivo aislado de la reivindicación 1; y
 incubar el sustrato en condiciones adecuadas para el crecimiento de hongos para producir la cepa BVT Cr-7 de *Clonostachys rosea* f. *rosea*.
- 55 15. El método de la reivindicación 14, en el que el sustrato es un sustrato estéril, opcionalmente semillas estériles tales como semillas de cebada.