



(11) **MX 2014003305 A**

(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **21/09/2015** (51) Int. Cl: **A01N 63/04** (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
(22) Fecha de presentación: **19/03/2014**
(21) Número de solicitud: **2014003305**

(71) Solicitante:
**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.
Camino a la Presa San Jose No. 2055 78216 SAN LUIS
POTOSI San Luis Potosí MX**

(72) Inventor(es):
**ALFREDO HERIBERTO HERRERA ESTRELLA
Paseo de la Fundación N° 1088 Irapuato Guanajuato
36670 MX
J. SERGIO CASAS FLORES
MIGUEL ANGEL SILVA FLORES**

(74) Representante:
**NORMA ISABEL GARCIA CALDERON
Camino a la Presa San José No 2055 San Luis Potosí
San Luis Potosí 78216 MX**

(54) Título: **CEPA DE TRICHODERMA HARZIANUM CON ACTIVIDAD ANTAGONICA CONTRA HONGOS FITOPATOGENOS, COMPOSICIONES QUE LA CONTIENEN Y USO DE LA MISMA.**

(54) Title: **STRAIN OF TRICHODERMA HARZIANUM WITH AN ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST PLANT PATHOGENS, COMPOSITIONS CONTAINING THE SAME AND USE THEREOF.**

(57) Resumen

La presente invención describe y reclama una cepa novedosa del hongo *Trichoderma harzianum* NRRL-50453. La utilización de esta cepa disminuye considerablemente el uso abonos y de pesticidas químicos cuya fabricación y uso dañan el medio ambiente y la salud humana.

(57) Abstract

The present invention describes and claims a novel strain from the *Trichoderma harzianum* fungus NRRL-50453. The use of this strain reduces in a substantial manner the application of manures and chemical pesticides which manufacture and use damage the environment and human health.

**Cepa de *Trichoderma harzianum* con actividad antagónica
contra hongos fitopatógenos, composiciones que la contienen y uso de
la misma**

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo de la agrobiotecnología, dado que describe y reclama una cepa Mexicana del hongo *Trichoderma harzianum* capaz de proveer defensa contra
10 fitopatógenos y promotora del crecimiento de manera significativa en plantas de interés agronómico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En México, la horticultura es una de las actividades más importantes desde el punto de vista económico y social. Una de las
15 principales limitantes en la producción de las hortalizas, son las enfermedades bacterianas, fúngicas y virales, las cuales llegan a generar pérdidas hasta del 100%. En la mayoría de los casos, las enfermedades son combatidas con la aplicación de compuestos químicos, los cuales resultan altamente tóxicos para el hombre y son
20 poco amigables con el medio ambiente.

Una opción para llevar a cabo el control biológico de patógenos en plantas, sin necesidad de la aplicación de químicos es mediante el

uso de microorganismos capaces de combatir a los fitopatógenos, ya sea porque producen sustancias químicas capaces de eliminar a los patógenos o porque sean capaces de alterar el metabolismo de las plantas induciendo su sistema de defensa. Así, los agentes de control biológico pueden funcionar a través de varios modos de acción como: la antibiosis, el parasitismo, la competencia, la hipovirulencia, y la inducción de respuestas de defensa de las plantas. Estos modos de acción pueden estudiarse *in vitro* o sobre plantas bajo condiciones controladas. Herrera-Estrella, A. y Chet, I. 2004. "The Biological Control Agent *Trichoderma* from Fundamentals to Applications". En "Handbook of Fungal Biotechnology 2/e" Arora, D. (Ed.). Marcel Dekker, Inc. New York 10016, U.S.A. Vol. 21, pp. 147-156.

Hasta el momento, se han utilizado cepas de *Trichoderma* de diversas especies tales como *T. harzianum*, *T. pseudoharzianum* (Druzhinina et al 2010), *T. atroviride* ó *T. asperellum* como agentes de biocontrol contra hongos fitopatógenos de géneros tales como *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Sclerotinia* y *Fusarium* (Fravel, 2005. Annu. Rev. Phytopathol. 43: 337-359). Los hongos pertenecientes al genero *Trichoderma* pueden actuar directamente sobre otros hongos una vez que estos los detectan, respondiendo con la producción de antibióticos, la formación de estructuras especializadas tipo apresorio y

la degradación de la pared celular del huésped, seguido por la asimilación de su contenido celular en un proceso conocido como micoparasitismo (Chet and Chernin 2002. Encyclopedia of Environmental Microbiology. G. Bitton, ed. John Wiley and Sons, New York. 450-465; Benitez *et al.*, 2004. Int. Microbiol. 7:249-260). Adicionalmente, estos hongos son capaces de colonizar y crecer en asociación con las raíces de las plantas incrementando significativamente el crecimiento y desarrollo de estas (Ahmad and Baker 1987. Phytopathology. 77:182-189).

10 Ahora bien, *Trichoderma harzianum* es una especie ubicua en el ambiente en donde ciertas cepas han sido explotadas para control biológico de hongos fitopatógenos.

Asimismo, existen patentes y solicitudes publicadas sobre el tema y citamos a continuación las más relevantes.

15 La patente de los Estados Unidos 4,915,914, describe el uso de una cepa del hongo micoparásito *Trichoderma harzianum* T-315 (ATCC No. 20671), la cual es capaz de controlar a oomicetos como *Phyitium* y hongos fitopatógenos del genero *Rhizoctonia*, *Sclerotium* y *Fusarium*, además de tener la particularidad de ser resistente a fungicidas. La
20 describen como una cepa para controlar principalmente enfermedades de plantas causadas por hongos fitopatógenos del suelo. A diferencia de dicha patente, la cepa de la presente invención

protege a los cultivos de solanáceas, especialmente chile de manera más eficiente que las cepas de la patente norteamericana en comento, tal y como se podrá comprobar en los ejemplos de la presente solicitud.

5 La patente de los Estados Unidos 6,890,530, describe especies del genero *Trichoderma* como *T. asperillum*, *T. atroviride*, *T. inhamatum* y mezclas de las mismas para ser utilizadas en el control biológico de organismos fitopatógenos. Describen a la composición como ideal para proteger o tratar plantas contra infecciones y enfermedades
10 causadas por patógenos de plantas y/o para estimular el crecimiento de las mismas. También mencionan que esta mezcla es capaz de inducir la resistencia sistémica de las plantas a enfermedades causadas por organismos fitopatógenos. La principal diferencia de la patente en cuestión, radica en que en el presente invento está basado
15 en la actividad sobresaliente de una cepa de *T. harzianum* capaz de promover el crecimiento y de proteger a la planta de bacterias y hongos fitopatógenos de manera significativa en comparación con las cepas comerciales.

 En vista de los antecedentes de la invención, el problema
20 técnico que se resuelve es la descripción, uso y procedimiento de aplicación de una cepa novedosa de *T. harzianum* capaz tanto de inducir el crecimiento como de promover el sistema de defensa contra

fitopatógenos en plantas de interés agronómico, lo cual hace que la presente invención sea novedosa, inventiva y con una aplicación industrial concreta para el campo de la agricultura. Su comportamiento en campo es significativamente mejor que las cepas de referencia o comerciales existentes en el mercado. Esto queda comprobado con los ensayos de promoción del crecimiento y de defensa contra hongos fitopatógenos y bacterias, mismos que demostraron que la cepa generada supera significativamente el rendimiento de las cepas comerciales.

10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1. Cultivos duales o de confrontación de *Trichoderma* vs oomicetos y hongos fitopatógenos. El hongo aislado de suelo, *T. harzianum* NRRL-50453 (Th) y los de la colección propia de cepas de *Trichoderma atroviride* IMI206040 (Ta), *Trichoderma virens* GV29.8 (Tv) fueron confrontados contra los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* (Fo), *Phytophthora capsici* (Pc), *Rhizoctonia solani* (Rs) y *Sclerotium rolfsii* (Sr) en cultivos duales por 72 h a 25 °C en medio PDA para determinar su capacidad de sobrecrecer, o inhibir el crecimiento de los fitopatógenos.

20 **Figura 2.** Ensayos de antibiosis. Para determinar la capacidad de los hongos del género *Trichoderma* de producir metabolitos capaces de matar o inhibir el crecimiento de los fitopatógenos. En la primera

columna están las cepas control sin confrontación alguna. En la segunda columna se encuentra la cepa *T. virens* Gv29-8, en la segunda *T. atroviride* IMI206040 (Ta) y en la tercera columna la cepa *T. harzianum* NRRL-50453. Las cepas fueron crecidas en medio PDA
 5 cubierto con una membrana de celofán, una vez que este creció sobre un 75% de la superficie se retiró por medio de la membrana y se inoculó sobre el medio al fitopatógeno. Los fitopatógenos seleccionados son: *Fusarium oxysporum* (Fo), *Sclerotium rolfsii* (Sr), *Phytophthora capsici*, (Pc) y *Rhizoctonia solani* (Rs).

10 **Figura 3.** Comparación del peso fresco de plántulas de chile en campo. En el eje de las ordenadas se describe el tratamiento: 1: Control absoluto (C); 2: *T. harzianum* NRRL-50453 (Th); 3: TvG42, cepa de laboratorio de *T. virens* (TvG42); 4: Th22 cepa comercial de *Trichoderma harzianum* (Th22); 5: Control químico (CQ). En el eje de las
 15 abscisas se describe el peso en gramos.

Figura 4. Comparación del peso seco de plántulas de chile en campo. En el eje de las ordenadas se describe el tratamiento: 1: C: Control absoluto; 2: Th:*T. harzianum* NRRL-50453; 3: TvG42, cepa de laboratorio de *T. virens*; 4: Th22: cepa comercial de *T. harzianum*; 5: CQ:
 20 Control químico. En el eje de las abscisas se describe el peso en gramos.

Figura 5. Efecto de diferentes cepas de *Trichoderma* en la protección de plantas de chile en campo, muestreo 1. En el eje de las ordenadas se describe el tratamiento: 1: (C)Control absoluto; 2: Th:*T. harzianum* NRRL-50453; 3: TvG42, cepa de referencia de *T. virens*; 4: Th22 cepa comercial de *T. harzianum*; 5: Control químico. En el eje de las abscisas se describe el porcentaje de daño.

Figura 6. Efecto de diferentes cepas de *Trichoderma* en la protección de plantas de chile en campo, muestreo 2. En el eje de las ordenadas se describe el tratamiento: 1: (C) Control absoluto; 2: Th: *T. harzianum* NRRL-50453; 3: TvG42, cepa de referencia de *T. virens*; 4: Th22 cepa comercial de *T. harzianum*; 5: Control químico. En el eje de las abscisas se describe el porcentaje de daño.

Figura 7. Efecto de diferentes cepas de *Trichoderma* en la protección de plantas de chile en campo, muestreo 3. En el eje de las ordenadas se describe el tratamiento: 1: (C) Control absoluto; 2: (Th) *T. harzianum* NRRL-50453; 3: TvG42, cepa de referencia de *T. virens*; 4: Th22 cepa comercial de *Trichoderma harzianum*; 5: Control químico. En el eje de las abscisas se describe el porcentaje de daño.

Figura 8. Rendimiento de chile poblano con diferentes tratamientos en condiciones de cultivo. Se cuantificó el rendimiento de la cosecha por tipo de tratamiento. En el eje de las ordenadas se describe el tratamiento: 1: (C) Control absoluto; 2: (Th) *T. harzianum*

NRRL-50453; 3: TvG42, cepa de referencia de *T. virens*; 4: Th22 cepa comercial de *Trichoderma harzianum*; 5: Control químico. En el eje de las abscisas está cuantificado el rendimiento en kilogramos.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a una cepa de *T. harzianum*, con número de acceso NRRL-50453, capaz de promover el crecimiento y la resistencia a fitopatógenos en plantas.

 En otro aspecto de la presente solicitud, se describe y reclama un método para promover el crecimiento y la resistencia a
10 fitopatógenos en plantas, que comprende aplicar una cepa de *T. harzianum* como la mencionada anteriormente, a una planta, plántula, semilla de planta ó al suelo, en condiciones efectivas para promover el crecimiento y la resistencia a fitopatógenos en la planta o en la planta crecida a partir de dicha semilla; en donde dicha
15 aplicación es llevada a cabo en forma de solución líquida o en surco, aplicación directa en el suelo o en mezclas para plantar, en forma sólida tal como polvos o gránulos, o por tratamiento de las semillas, en donde la planta es por ejemplo, solanácea.

 Adicionalmente, se describe y reclama el uso de la multicitada
20 cepa para preparar una formulación agronómica para promover el crecimiento y la resistencia a fitopatógenos, tales como oomicetos, hongos y/o bacterias en plantas solanáceas, preferentemente chile.

Por último, es una modalidad adicional de la presente invención, describir y reclamar una formulación agronómica, que comprende una cepa de *T. harzianum* como la que se menciona anteriormente y un vehículo agronómicamente aceptable, en donde dicha formulación agronómica promueve el crecimiento y la resistencia a oomicetos, bacterias y hongos fitopatógenos en plantas solanáceas, preferentemente chile y en donde dicha formulación está en forma de polvo, suspensión líquida o gránulos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

10 Aislamiento y caracterización de la cepa.

La estrategia a seguir fue buscar plantas de chile y tomate en zonas prácticamente devastadas por las enfermedades (en invernadero y en campo), que presentaran una apariencia sana y robusta, creciendo en zonas con plantas muy enfermas, lo cual en principio sugiere que presentan condiciones en la rizosfera de crecimiento diferentes a las plantas que las rodean. También se colectaron plantas con síntomas de enfermedad con la finalidad de aislar a los fitopatógenos y posteriormente realizar los ensayos de confrontación *in vitro* y de protección en invernadero. Posterior a la colecta del material biológico, las raíces fueron separadas y cortadas en fragmentos, para después colocarlas en cajas de Petri con medios para hongos o bacterias, sobre los cuales fueron aislados los

microorganismos que crecieron. Posteriormente estos fueron crecidos en medio líquido para el caso de bacterias y los hongos fueron crecidos en medio sólido PDA con un celofán. El ADN fue extraído y utilizado como templado para realizar una PCR con oligonucleótidos
5 específicos para bacterias (rDNA 16S) y para hongos respectivamente (rDNA 18S). Los fragmentos o amplicones resultantes fueron clonados y secuenciados. De ahí se seleccionó una cepa misma que fue caracterizada molecularmente y correspondió a la especie *T. harzianum*, denominada IPI001.

10 Deposito de las cepas:

Se depositó la cepa con mejor actividad de la especie *Trichoderma harzianum* de acuerdo a lo siguiente:

La cepa de *Trichoderma harzianum* IPI001 ha sido depositada bajo los términos del Tratado de Budapest, en el Agricultural Research
15 Service Culture Collection (ARS Patent Culture Collection, 1815 North University St, Peoria, IL, 61604, Estados Unidos de Norteamérica). El número de acceso indicado se asignó después de la verificación de la viabilidad de la cepa, y se han pagado los impuestos de requisición. El acceso a dicha cepa será posible durante el trámite de la solicitud de
20 patente. Todas las restricciones sobre la disponibilidad de dicha cepa al público se removerán irrevocablemente una vez que se acepte la patente basándose en la solicitud. Además, el depósito designado se

mantendrá por un periodo de treinta (30) años desde la fecha de depósito, o cinco (5) años después de la última requisición para el depósito, o para la vida de cumplimiento de la patente mexicana, cuan larga sea. Si la cepa se vuelve no viable o inadvertidamente es destruida, será reemplazada con una cepa viable. Así, la cepa descrita y reclamada en la presente invención, corresponde a lo mostrado en la siguiente tabla:

Nombre de la cepa	Fecha de Depósito	Número NRRL
<i>Trichoderma harzianum</i> IPI001	30 de noviembre de 2010	NRRL-50453

Formulaciones que contienen la cepa *Trichoderma harzianum* y métodos de aplicación.

Una vez que la cepa de *T. harzianum* IPI001 fue identificada y depositada con el No. de Depósito NRRL-50453, fue crecida a una densidad deseada en un medio de cultivo apropiado para el organismo, bajo condiciones óptimas para su mantenimiento, y si se desea para expandir la densidad de población celular antes de su aplicación de acuerdo a lo divulgado en la presente invención.

La presente invención también se relaciona con un método para promover el crecimiento y promover la resistencia a fitopatógenos, ya sea hongos o bacterias en plantas solanáceas. Esto incluye aplicar la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453, preparada de acuerdo a lo descrito previamente a una planta o semilla de planta, bajo condiciones

efectivas para promover el crecimiento y la resistencia a fitopatógenos.

En una modalidad de la presente invención, la cepa puede ser inoculada a las plantas, las raíces de las plantas o las semillas en
5 diversas formas, ya sea directamente a las raíces, al suelo en donde la semilla o la planta ha sido cultivada de acuerdo a lo siguiente:

La cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 de la presente invención puede ser formulada o mezclada para preparar gránulos, polvos o suspensiones líquidas. Estas pueden ser incorporadas directamente en
10 el suelo o mezclas para cultivo. Las preparaciones son posteriormente mezcladas en el suelo o en la mezcla para cultivo para aplicaciones a nivel invernadero o a nivel de campo.

El equipo y los procedimientos para dichas aplicaciones son conocidos en la técnica y utilizados en varias empresas agrícolas. De
15 manera regular, se aplican entre 1 a 5 kg del producto que contenga de 10^1 a 10^{11} unidades formadoras de colonias (ucf) por metro cúbico de suelo o mezclas para cultivo. La cantidad de producto formulado puede ser ajustada proporcionalmente a una mayor o menor cantidad de unidades formadoras de colonias. Una cantidad adecuada de
20 unidades formadoras de colonias para los efectos de la presente invención y a nivel comercial va de 10^6 a 10^{11} . Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones líquidas de la cepa

de *T. harzianum* NRRL-50453 de la presente invención, mezclando las formulaciones en polvo con agua u otro vehículo acuoso, como soluciones fertilizantes. Tales soluciones pueden ser utilizadas para regar los sitios de cultivo tanto antes de plantar como cuando las plantas
5 están creciendo en los mismos.

Los polvos secos que contienen la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 de la presente invención pueden ser aplicados como polvos finos a raíces, plántulas o semillas. Dichos polvos finos (con un tamaño de grano igual o menor a 250 μm) contienen entre 10^6 a 10^{11} unidades
10 formadoras de colonia por gramo.

Las suspensiones líquidas antes mencionadas pueden ser preparadas para aplicarse en los surcos de cultivo. Tales materiales pueden ser agregados a los surcos en donde las semillas son plantadas o donde se transplantan las plántulas. Los equipos para realizar dichas
15 aplicaciones son ampliamente utilizados en la industria agrícola. Las cantidades típicas para aplicación son entre 1 y 10 kg de producto (10^6 a 10^{11} ufc/g) por hectárea de cultivo.

Los gránulos pueden ser aplicados a la superficie del suelo que contengan plantas en crecimiento, al suelo al momento del cultivo o
20 en suelos en donde las semillas o las plántulas van a ser plantados. Las cantidades típicas para las aplicaciones van de 1 a 10 kg de producto (10^6 a 10^{11} ufc/g) por hectárea de cultivo. Adicionalmente, se pueden

preparar soluciones tipo spray y aplicarlos en cantidades similares. Se incorporan únicamente como referencia de lo anterior y a manera de ejemplo los siguientes artículos, sin que los mismos constituyan arte previo para la presente invención: Harman, G. E., "The Dogmas and
5 Myths of Biocontrol. Changes in Perceptions Based on Research with *Trichoderma harzianum* T-22," Plant Dis. 84, 377-393 (2000); Lo et al., "Biological Control of Turfgrass Diseases With a Rhizosphere Competent Strain of *Trichoderma harzianum* " Plant Dis. 80, 736-741 (1996); Lo et al., "Improved Biocontrol Efficacy of *Trichoderma harzianum* 1295-22 For
10 Foliar Phases of Turf Diseases By Use of Spray Applications," Plant Dis. 81: 1132-1138 (1997).

En otra modalidad de la presente invención, la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 es aplicable directamente a las semillas, utilizando cualquier método de tratamiento de semillas conocido en el
15 arte. Por ejemplo, las semillas son tratadas comúnmente utilizando pastas, recubrimientos tipo film o pastillas por procesos conocidos en el comercio (Harman et al, "Factors Affecting *Trichoderma hamatum* Applied to Seeds As a Biocontrol Agent," Phytopathology 71: 569-572 (1981); Taylor et al., "Concepts and Technologies of Selected Seed
20 Treatments," Ann. Rev. Phytopathol 28: 321-339 (1990)), los cuales se incorporan a la presente como meras referencias en su totalidad, sin que constituyan arte previo para la misma).

Procedimiento de aplicación de las cepas

Para aplicar la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453, ya sea sola o como parte de la composición antes descrita, se pueden preinocular
5 las semillas con una cantidad agronómicamente efectiva de dicha cepa para posteriormente sembrar las semillas de las plantas de manera tradicional.

Otra modalidad de la invención incluye aplicar la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 ya sea sola o como parte de la formulación
10 antes descrita directamente en la raíz de plantas. La cepa puede aplicarse como gránulos, polvo o solución líquida sobre el suelo del cultivo.

**Uso de la cepa para promoción de crecimiento y resistencia a
15 fitopatógenos**

La cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 de la presente invención, es óptima para utilizarse tanto sola, como en combinación con vehículos agronómicamente aceptables, para preparar formulaciones para promover el crecimiento y la resistencia a fitopatógenos, tales como
20 hongos o bacterias en plantas solanáceas, de manera notable y no obvia en comparación tanto con otras cepas obtenidas durante la fase de investigación realizada para la concreción del invento, como

en comparación con las cepas silvestres de referencia o de cepas comerciales.

De tal forma que, a la luz de la descripción detallada de la invención, a continuación se exponen los siguientes ejemplos experimentales para ilustrar la mejor manera de llevar a cabo la invención, sin que por ello se limite el alcance originalmente descrito y reclamado en la presente solicitud.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

10 Ensayo de confrontación de la cepa de *Trichoderma harzianum* NRRL-50453 vs. Fitopatógenos.

Se realizaron ensayos de confrontación de las diferentes cepas de *Trichoderma* y la cepa de *T. harzianum* de la presente invención aisladas contra los oomicetos y hongos fitopatógenos que se aislaron de plantas de chile y tomate colectados en los diferentes predios, tales como *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. En la Figura 1 se muestran resultados representativos de los experimentos de ensayos duales o de confrontación. Así, el hongo descrito y reclamado en la presente invención, a saber, *T. harzianum* NRRL-50453 y los de la colección de cepas de *T. atroviride* IMI206040, *T. virens* GV29.8 fueron confrontados contra los fitopatógenos *F. oxysporum* (Fo), *P. capsici* (Pc), *R. solani* (Rs) y *S. rolfsii*

(Sr) en cultivos duales por 72 h a 25 C en medio PDA para determinar su capacidad de sobrecrecer, o inhibir el crecimiento de los fitopatógenos. Los experimentos de confrontación fueron evaluados en base a la capacidad de las cepas de *Trichoderma* para sobrecrecer a los aislados de los oomicetos y hongos fitopatógenos. De estos resultados observamos que en general presentan un patrón de sobrecrecimiento semejante o menor al de las cepas de referencia (*T. atroviride* IMI206040 y *T. virens* Gv29-8), sin embargo, entre ellas, la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 resultó mucho más eficiente para sobrecrecer a los fitopatógenos y formar la característica línea de lisis en la zona donde inicia la interacción de *Trichoderma* con el hongo que confrontado, en comparación con las cepas de referencia o comerciales, por lo que la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 supera ampliamente a las cepas comerciales y de referencia existentes.

15

Ejemplo 2

Ensayo de antibiosis de la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 vs. Fitopatógenos.

También se realizaron pruebas de antibiosis de las cepas de *Trichoderma* y *T. harzianum* NRRL-50453 contra los fitopatógenos que se mencionaron en las pruebas de confrontación. Como se puede observar en la figura 2, la cepa de referencia *T. virens* Gv29-8 fue

20

capaz de inhibir el crecimiento de *R. solani*, *S. rolfsii*, pero no contra los dos aislados de *P. capsici* o *F. oxysporum*, mientras que la cepa de *T. atroviride* IMI206040 inhibió prácticamente a todos los fitopatógenos. La cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 aunque no inhibió el crecimiento de manera tan efectiva como lo hizo la cepa de *T. atroviride* o *T. harzianum* comercial, fue seleccionada porqué retrasó notablemente el crecimiento de *P. capsici* y de *F. oxysporum* en comparación con el resto de las cepas de referencia, incluida la Gv29-8. Lo anterior demuestra de manera inequívoca y contundente la eficiencia de la cepa de la presente invención *T. harzianum* NRRL-50453 como inhibidora del crecimiento de los principales fitopatógenos que afectan los cultivos de solanáceas, en comparación con las cepas existentes en el mercado. En la Figura 2 se muestran resultados representativos de estos experimentos.

15

Ejemplo 3

Generación de inóculo de la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 en granos de trigo y arroz.

Se realizaron experimentos para la generación del inóculo de la especie de *T. harzianum* NRRL-50453 en granos de trigo y de arroz, donde se determinó que el mejor sustrato para la generación del inóculo es el arroz con una producción de 5.4×10^9 para la cepa de *T.*

20

harzianum NRRL-50453. Para trigo las UFC fue de 2.5×10^9 para *T. harzianum* NRRL-50453. Para tal efecto, se hicieron mezclas proporcionadas de arroz con vermiculita entre 25 a 75% de arroz y de 25% a 75% de vermiculita. A manera de ejemplo, se mezcla 25% arroz y 75% vermiculita v/v se esteriliza dos veces, posteriormente es inoculada con 10 ml de una suspensión de esporas 5×10^6 por ml de *T. harzianum* NRRL-50453 por cada 100 g de sustrato. Se incubaba de 7 a 12 días a 25°C con periodos de 12 h luz, 12 h oscuridad. Durante los 7 y los 12 días se hacen observaciones sobre el crecimiento y esporulación del hongo y se almacena una vez que se aprecia una esporulación adecuada.

Ejemplo 4

Evaluación de la actividad de la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 en campo.

Con el objetivo de proporcionarle al agricultor alternativas para el control de enfermedades de la raíz, que sean amigables con el medio ambiente, se evaluaron las distintas cepas de *Trichoderma* y la *T. harzianum* de la presente invención, en condiciones de campo. El experimento se realizó en un lote comercial de chile poblano muy susceptible a la enfermedad conocida como pudrición de la raíz (provocada por oomicetos como *Phytophthora capsici*, hongos como *R. solani*, *Fusarium* spp., etc) en el municipio de Moctezuma, San Luis Potosí. Este municipio se encuentra en las inmediaciones de lo que se

conoce como el Valle de Arista, la cual es considerada como una zona importante en la producción de chile a nivel nacional.

El trabajo se inició con una inoculación en almácigo de plántulas de chile a aproximadamente 30 días después de haberse sembrado, 5 posteriormente se le dio una segunda aplicación de las cepas 8 días previo al trasplante en campo.

Al momento del trasplante se tomaron muestras vegetales para determinar la biomasa de las plántulas. Una vez que se tomaron 10 plantas por tratamiento se llevaron al laboratorio para su 10 procesamiento, el cual, consistió en lavar perfectamente la raíz para posteriormente pesar la planta en una balanza analítica y determinar el peso fresco (Figura 3). Inmediatamente después se introdujeron en bolsas de papel de estraza y se colocaron en una estufa a 70 °C por 72 h. Transcurrido este tiempo se sacaron la muestras de la estufa y se 15 procedió a pesarlas de nueva cuenta con lo que obtuvimos el peso seco (Figura 4).

Los resultados obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico de SAS V8 para Windows, aplicando un análisis de varianza y comparación de medias, Tukey ($p < 0.5$), con los datos de peso fresco 20 y peso seco.

Ejemplo 5

Evaluación de la efectividad biológica de la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 en campo.

Para poder trasplantar en campo previamente se tuvieron que hacer una serie de adecuaciones a los surcos del lote donde se hizo el experimento. Estas adecuaciones consistieron en poner una llave de paso en cada surco. Estas llaves se manipularon, abriéndolas y cerrándolas, de acuerdo a las necesidades del experimento.

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Justo al momento del trasplante se hizo el sorteo sin reemplazo para determinar el orden de los tratamientos en cada bloque. Finalmente se distribuyeron conforme al sorteo: C Testigo absoluto, Th *T. harzianum* NRRL-50453, TvG42, cepa de referencia de *T. virens*, Th22 cepa comercial de *T. harzianum*, CQ Manejo convencional químico que se le da al cultivo. En este experimento se midieron dos variables: protección y rendimiento.

Ejemplo 6

Ensayo de protección de la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 vs. secadera en plantas de chile.

Durante el desarrollo del cultivo se hicieron 3 aplicaciones de las cepas en campo. Estas aplicaciones se realizaron aproximadamente cada 30 días. Primero se contabilizó cada 30 días el número total de plantas por surco, determinado un promedio de 300 plantas por surco.

Posteriormente se cuantificaron plantas vivas y plantas muertas por surco para determinar el porcentaje de plantas afectadas por la enfermedad conocida como secadera. Previo a cada aplicación de los tratamientos se cuantificaba el porcentaje plantas enfermas.

5 En el primer muestreo (Figura 5) podemos apreciar que existe un bajo porcentaje de plantas enfermas siendo el tratamiento control absoluto (C) donde se observó el mayor porcentaje (5.71%) de plantas con síntomas de enfermedad. Mientras que en los tratamientos con Th NRRL 50453, TvG42 y Th22, el porcentaje de plantas enfermas fue de
10 aproximadamente 2%. En cierta medida esto es comprensible puesto que el ciclo del cultivo en campo apenas iniciaba, ya que, esta se hizo 15 días después del trasplante realizando en esta misma fecha la primera aplicación de las cepas en campo. La segunda aplicación se hizo 30 días después del primer muestreo cuantificando plantas sanas y
15 plantas enfermas por surco para determinar el porcentaje de plantas enfermas.

 En el segundo muestreo (Figura 6) observamos que en los tratamientos donde se inocularon las diferentes cepas de *T.* y *T. harzianum* NRRL-50453 el porcentaje de plantas enfermas fue menor
20 comparado con el porcentaje de daño que se tenía en tratamientos como el control absoluto (C) (17.59% de daño) o el tratamiento químico convencional (CQ) (12.32%). Para las plantas tratadas con la

cepa Th NRRL-50453 el daño fue menor a 7.6% comparando Vs. CQ con una diferencia de casi el 5%, en condiciones de campo resulta ser importante, ya que esto puede llegar a reflejarse en el mejor de los casos en rendimiento.

- 5 Como antecedente mencionaremos que a mediados que el ciclo del cultivo, se estableció un periodo de lluvia, que se extendió, por cerca de 15 días. Esto en términos prácticos para el manejo fitosanitario, resulta ser una condición poco favorable, sobre todo en
- 10 suelos con antecedentes de perdidas severas de cultivos causadas por enfermedades radicales, como es el caso del lote donde se realizaron los experimentos. El lote que se destinó para la realización de este experimento se eligió dado sus antecedentes en ciclos previos donde en el inmediato anterior se tuvieron pérdidas cercanas al 90 % del cultivo, con un periodo de lluvias menor del presente ciclo agrícola.
- 15 Por lo anterior se realizó una tercera aplicación al inicio de las primeras detecciones de los problemas de "secadera", esta aplicación se realizo 8 días después de la segunda aplicación para incrementar el inoculo de las distintas cepas de *Trichoderma* en campo.

- 20 En la tercera evaluación del daño causado por el complejo de organismos que conforman la "secadera" encontramos que en tratamientos con Th NRRL-50453 proporciona una buena protección, pese a las condiciones climáticas, el daño apenas superó el 30%,

mientras que en el Control C o el CQ el porcentaje de daño alcanzó 85.67 y 47% respectivamente (Figura 7). A estas fechas y en otro tipo de condiciones durante el ciclo agrícola anterior ya se había perdido más del 90% de las plantas.

5 De los experimentos anteriores, se destaca el excelente comportamiento en campo de la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 de la presente invención, ya que se logró proteger los cultivos trabajados contra una plaga que normalmente causa una merma de los cultivos de más de 90% de las plantas. Esto es un indicativo claro sobre la
10 utilidad de la cepa de la presente invención.

Ejemplo 7.

Promoción del crecimiento en plantas por acción de la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453.

Se realizó una evaluación post-cosecha del rendimiento de los
15 chiles poblanos. Para tal efecto, se cuantificaron los chiles poblanos cosechados y que fueron tratados como en los ejemplos anteriores.

En la figura 8, se aprecia que el rendimiento de chile poblano en el cultivo tratado con la cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 fue al menos 33 % superior al rendimiento obtenido con el tratamiento químico o con
20 el control absoluto sin tratamiento. Asimismo, el rendimiento fue superior al de los cultivos de las cepas de referencia TvG42 y Th22 de manera significativa.

Por lo anterior, es evidente la utilidad de la cepa de la presente invención para promover el crecimiento de plantas, y sobretodo, el crecimiento del fruto, lo cual es de vital importancia para los agricultores, ya que se busca no solo que la planta esté protegida de fitopatógenos, sino además que el rendimiento de la cosecha (frutos) sea mejorado.

Puesto que se pueden hacer varios cambios a los métodos anteriormente mencionados y a las composiciones sin apartarse del alcance de la invención, se pretende que todos los asuntos contenidos en la descripción anteriormente dada y mostrada en las figuras acompañantes deben interpretarse como ilustrativos y no en un sentido limitante.

NOVEDAD DE LA INVENCION**REIVINDICACIONES**

1.- Una cepa de *T. harzianum*, depositada bajo los términos del
5 Tratado de Budapest, en el Agricultural Research Service Culture
Collection con número de acceso NRRL-50453.

2.- La cepa de conformidad con la reivindicación 1,
caracterizada además porque promueve el crecimiento y la
resistencia a fitopatógenos en plantas.

10 3.- La cepa de conformidad con cualquiera de las
reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada además porque la planta es chile.

4.- Un método para promover el crecimiento y la resistencia a
fitopatógenos en plantas, caracterizado porque comprende aplicar
una cepa de *T. harzianum* NRRL-50453 como la que se reclama en la
15 reivindicación 1, a una planta, plántula, semilla de planta ó al suelo, en
condiciones efectivas para promover el crecimiento y la resistencia a
fitopatógenos en la planta o en la planta crecida a partir de dicha
semilla.

20 5.- El método de conformidad con la reivindicación 5,
caracterizado además porque dicha aplicación es llevada a cabo en
forma de solución líquida o en surco, aplicación directa en el suelo o

en mezclas para plantar, en forma sólida tal como polvos o gránulos, o por tratamiento de las semillas.

6.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, caracterizado además porque la planta es chile.

5 7.- El uso de una cepa como la que se reclama en la reivindicación 1, para preparar una formulación agronómica para promover el crecimiento y la resistencia a fitopatógenos, tales como hongos y/o bacterias en plantas solanáceas.

8.- El uso de conformidad con la reivindicación 7, en donde la
10 planta solanácea es chile.

9.- Una formulación agronómica, caracterizada porque comprende una cepa de *T. harzianum* como la que se reclama en la reivindicación 1 y un vehículo agronómicamente aceptable.

10.- La formulación agronómica de conformidad con la
15 reivindicación 9, caracterizada además porque promueve el crecimiento y la resistencia a bacterias y hongos fitopatógenos en plantas solanáceas.

11.- La formulación agronómica de conformidad con la
reivindicación 10, caracterizada además porque la planta solanácea
20 es chile.

12.- La formulación agronómica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizada además porque está en forma de polvo, suspensión líquida o gránulos.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención describe y reclama una cepa novedosa del hongo *Trichoderma harzianum* NRRL-50453. La utilización de esta
5 cepa disminuye considerablemente el uso abonos y de pesticidas químicos cuya fabricación y uso dañan el medio ambiente y la salud humana.