

(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **25/02/2013** (51) Int. Cl: **A01N 63/00** (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
(22) Fecha de presentación: **23/08/2011**
(21) Número de solicitud: **2011008890**

(71) Solicitante:
**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO
NACIONAL
Camino La Presa San José No. 2055 78126 San Luis
Potosí 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:
**DANIEL BARRON PASTOR
Camino a la Presa Sn Jose 2055 SAN LUIS POTOSI
San Luis Potosí 78216 MX**

(54) Título: **CEPA DE TRICHODERMA CITRINOVIRIDE CON ACTIVIDAD ANTAGONICA CONTRA HONGOS
FITOPATÓGENOS Y DE PROMOCION DE CRECIMIENTO, COMPOSICIONES QUE LA TIENEN Y USO DE LA MISMA.**

(54) Title: **STRAIN OF TRICHODERMA CITRINOVIRIDE ACTING AS ANTAGONIST OF PHYTOPATOGHEN FUNGI AND
GROUTH PROMOTER, COMPOSITIONS CONTAINING THE SAME AND USE THEREOF.**

(57) Resumen

La presente invención describe y reclama una cepa novedosa del hongo *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452, capaz de promover el crecimiento y la resistencia a fitopatógenos en plantas de interés agronómico de una manera muy superior en comparación con las cepas comerciales existentes hoy en día. 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 of the *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452 fungus, which promotes the growth and resistance to phytopathogens in plants of agricultural interest in a significant manner unlike traditional strains. The use of said 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 citrinoviride* con actividad antagónica
contra hongos fitopatógenos y de promoción de crecimiento,
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 del hongo *Trichoderma citrinoviride*, capaz de promover el crecimiento y proveer
10 defensa contra fitopatógenos de una manera significativa en plantas solanáceas de interés agronómico como el chile y el jitomate entre otras. La utilización de estas cepas ayudan a disminuir considerablemente el uso de abonos y de pesticidas químicos, cuya fabricación y uso dañan considerablemente el medio ambiente y la
15 salud de los humanos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En México, la horticultura es una de las actividades más importantes desde el punto de vista económico y social. Entre las
20 principales hortalizas cultivadas en México se encuentran el tomate y el chile. Una de las principales limitantes en la producción de estas 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 pesticidas químicos, los cuales resultan altamente tóxicos para el hombre y son poco amigables con el medio ambiente.

5 El gran interés despertado por el control biológico de patógenos de plantas es una respuesta en gran parte a la creciente preocupación de la sociedad acerca del uso de pesticidas químicos. Recientemente, se reportó que más de 70 pesticidas incluyendo fumigantes de suelo han sido detectados en aguas del subsuelo en 38 estados de la Unión
10 Americana. Un estudio publicado por la agencia estadounidense de protección ambiental (EPA) indica que tan solo en los Estados Unidos de 3000-6000 casos de cáncer son inducidos anualmente por residuos de pesticidas en alimentos y otros 50-100 por la exposición a estos durante su aplicación (Elad y Chet, 1995). El gobierno de muchos países está
15 cada día más consciente de la problemática de muchos pesticidas químicos en términos de su impacto en el medio ambiente así como en los agricultores y los consumidores de productos agrícolas. Además, los patógenos han llegado a adquirir resistencia contra los pesticidas, en consecuencia, deben buscarse métodos alternativos para el control de
20 las enfermedades de plantas. La reducción o el reemplazo de químicos pueden llevarse a cabo con la aplicación de microorganismos

benéficos que ataquen directamente a los patógenos o que induzcan el sistema de defensa de las mismas plantas, o ambos.

Sin embargo, antes de que el control biológico llegue a ser un componente importante en el manejo de enfermedades de plantas, este debe ser efectivo, confiable, consistente y económico. Para alcanzar estos criterios, se deben desarrollar cepas superiores junto con sistemas de aplicación que incrementen la actividad biocontroladora. Además, podemos pensar en los microorganismos con actividad inhibitoria contra patógenos de plantas como fuentes potenciales de genes de resistencia a enfermedades.

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. Es de primordial importancia conocer la proporción y temporalidad de cada modo de acción que pueda llevarse a cabo. Este tipo de información puede obtenerse de estudios *in vitro* o usando plantas crecidas bajo condiciones gnotobióticas, donde la actividad potencial de estos agentes puede ser valorada.

Los hongos filamentosos del genero *Trichoderma*, viven libremente en el suelo y están siendo utilizados y comercializados con mucho éxito para el control de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* y *Botrytis cinerea* entre otros (Fravel,

2005. Annu. Rev. Phytopathol. 43: 337-359). El hongo *Trichoderma spp.* puede actuar directamente sobre otros hongos una vez que este los detecta, respondiendo con la producción de antibióticos, la formación de estructuras especializadas tipo apresorio y la degradación de la pared celular del hospedero, 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). También se ha reportado que la colonización de las raíces de las plantas por *Trichoderma* inducen la resistencia local y sistémica al ataque de fitopatógenos (Shoresh *et al.*, 2005. Phytopathology. 95:76-84). La defensa de las plantas es inducida por moléculas llamadas elicitores y en los últimos años varias moléculas de este tipo han sido descritas (Nimchuck *et al.*, 2003. Annu. Rev. Genet. 37:579-609).

Las investigaciones sobre la utilización de organismos benéficos que protejan e induzcan el crecimiento en las plantas está en pleno auge debido a las restricciones cada vez más fuertes con respecto al uso de fungicidas químicos y la producción de fertilizantes, cuyo

aplicación y fabricación generan una gran cantidad de contaminantes perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana.

A este respecto, en la presente invención se ha detectado una
5 cepa de *Trichoderma citrinoviride* capaz de promover el crecimiento de plantas solanáceas, entre ellas chile y con una actividad contra patógenos.

El estado de la técnica comprende únicamente dos documentos que mencionan a la especie descrita en la presente
10 solicitud: CN101637188 (A) y CN101637187 (A). Aún cuando describen cepas de *Trichoderma* para protección de plantas contra diversos patógenos, mencionando *Phytophthora* del chile verde, se trata de una mezcla de dos especies de *Trichoderma*.

Sin embargo, en la presente solicitud se describe una única cepa
15 de *Trichoderma citrinoviride* que posee tanto la actividad fitoprotectora como la promotora de crecimiento al ser utilizada en cultivos de solanáceas, especialmente chile.

Ahora bien, existen diversos documentos de patente y de la literatura que a *Trichoderma citrinoviride*, sin embargo, dichos
20 documentos pertenecen a otros campos técnicos, principalmente alimentos y no afectan la patentabilidad de la presente solicitud.

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

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 los hongos fitopatógenos del genero *Phyitium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* y *Fusarium*, además de tener la particularidad de ser resistente a pesticidas. La describen como una cepa para controlar principalmente enfermedades de plantas causadas por hongos fitopatógenos del suelo. A diferencia de la patente en cuestión, 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.

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 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 en la actividad sobresaliente de una cepa de *Trichoderma citrinoviride* capaz de promover el crecimiento y de proteger a la planta de bacterias y hongos fitopatógenos de manera significativa en comparación con las cepas parentales.

En vista de los antecedentes de la invención, el problema técnico que se resuelve es la descripción, uso y procedimiento de aplicación de una cepa novedosa de *Trichoderma-citrinoviride* capaz tanto de inducir el crecimiento como de promover el sistema de defensa contra fitopatógenos en plantas solanáceas, 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, ya que ha sido aislada de zonas de cultivo de plantas solanáceas y por lo tanto está tropicalizada a las condiciones edáficas, ambientales y relación planta-microorganismo necesaria para las enfermedades existentes en los cultivos nacionales de solanáceas. 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.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Ensayos duales o de confrontación de *Trichoderma* vs Oomicetos y hongos fitopatogénos. Los hongos aislados de suelo, como 1: *T. harzianum*, 2: *T. citrinoviride* NRRL-50452 y los de la colección
5 propia de cepas de 3: *Trichoderma atroviride* IMI206040, 4: *Trichoderma virens* GV29.8 fueron confrontados contra los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* (Fo), *Phytophthora capsici* (Pc), *Rhizoctonia solani* (Rs) y *Sclerotium cepivorum* (Sc) en cultivos duales por 72 h a 25 C en medio PDA para determinar su capacidad de sobrecrecer, o inhibir el
10 crecimiento de los fitopatógenos.

Figura 2. Ensayos de antibiosis. Para determinar la capacidad de los hongos de producir metabolitos capaces de matar o inhibir el crecimiento de los fitopatógenos, se realizaron dos tipos de ensayos. En el primero se creció a las diferentes cepas de *Trichoderma virens* Gv29-
15 8 (Tv), *Trichoderma atroviride* IMI206040 (Ta), *Trichoderma harzianum* (Th) y *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452 (Tc) en medio PDA 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 inocularó sobre el medio al fitopatógeno. Se comparó el crecimiento del fitopatógeno
20 con su crecimiento en cajas control conteniendo PDA (control). Los fitopatógenos seleccionados son: *Fusarium oxysporum* (Fo), *Sclerotium cepivorum* (Sc) *Phytophthora capsici* (Pc4 y Pc), y *Rhizoctonia solani* (Rs).

Figura 3. Comparación del peso fresco de plántulas de chile en campo. En el eje de las ordenadas se describe el tratamiento: T: Control absoluto; TC: *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452; CQ: Control químico; Th22: Th22 cepa comercial de *Trichoderma harzianum*; TvG42: cepa de laboratorio de *Trichoderma virens*. En el eje de las 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: T: Control absoluto; CV: *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452; CQ: Control químico; Th22: cepa comercial de *Trichoderma harzianum*; TvG42: cepa de laboratorio de *Trichoderma virens*. En el eje de las abscisas se describe el peso en gramos.

Figura 5. Efecto en el crecimiento de diferentes diluciones ($1/2$, $1/4$, $1/8$ y $1/16$) de las moléculas promotoras del crecimiento en plántulas de chile poblano, obtenidas por crecimiento de *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452 (Tc) en medio mínimo líquido. En el eje de las ordenadas se muestran diferentes diluciones del cultivo de T. citrinoviride NRRL-50452 (Tc) crecida con medio MS y este último como control (MS). El eje de las abscisas muestra el peso fresco en gramos.

Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes Tukey ($p \leq 0.5$).

Figura 6. Efecto en el crecimiento de diferentes diluciones (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) de las moléculas promotoras del crecimiento en plántulas de chile poblano, obtenidas por crecimiento de *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452 (Tc) en medio mínimo líquido. En el eje de las ordenadas se muestran diferentes diluciones del cultivo de *T. citrinoviride* NRRL-50452 (Tc) crecidas con medio MS y este último como control (MS). El eje de las abscisas muestra en peso seco en gramos Tukey ($p \leq 0.5$). Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente significativos.

Figura 7. 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: T: Control absoluto; CV: *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452; CQ: Control químico; Th22: cepa comercial de *Trichoderma harzianum*; TvG42: cepa de laboratorio de *Trichoderma virens*. En el eje de las abscisas se describe el porcentaje de daño...

Figura 8. 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: T: Control absoluto; CV: *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452; CQ: Control químico; Th22: cepa comercial de *Trichoderma harzianum*; TvG42: cepa de laboratorio de

Trichoderma virens. En el eje de las abscisas se describe el porcentaje de daño.

Figura 9. 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: T: Control absoluto; CV: *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452; CQ: Control químico; Th22: cepa comercial de *Trichoderma harzianum*; TvG42: cepa de laboratorio de *Trichoderma virens*. En el eje de las abscisas se describe el porcentaje de daño.

Figura 10. Rendimiento de chile poblano con diferentes tratamientos en condiciones de campo. En el eje de las ordenadas se describe el tratamiento: T: Control absoluto; CV: *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452; CQ: Control químico; Th22: cepa comercial de *Trichoderma harzianum*; TvG42: cepa de laboratorio de *Trichoderma virens*. En el eje de las abscisas se describe el rendimiento en kilos.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una cepa de *Trichoderma citrinoviride*; con número de acceso NRRL-50452, capaz de promover el crecimiento y la resistencia a fitopatógenos en plantas solanáceas, tal como el chile.

En otro aspecto de la presente solicitud, se describe y reclama un método para promover el crecimiento y la resistencia a

fitopatógenos en plantas, que comprende aplicar una cepa de *Trichoderma citrinoviride* 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
5 planta o en la planta crecida a partir de dicha semilla; en donde 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, en donde la planta es chile.

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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 template para realizar una PCR con oligonucleótidos 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 *Trichoderma citrinoviride*.

Deposito de las cepas:

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

La cepa de *Trichoderma citrinoviride* ha sido depositada bajo los
 5 términos del Tratado de Budapest, en el Agricultural Research 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
 10 dicha cepa será posible durante el trámite de la solicitud de 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
 15 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
 20 mostrado en la siguiente tabla:

Nombre de la cepa	Fecha de Depósito	Número NRRL
<i>Trichoderma citrinoviride</i> SFTc	30 de noviembre de 2010	NRRL-50452

Formulaciones que contienen la cepa *T. citrinoviride* y métodos de aplicación.

Una vez que la cepa *T. citrinoviride* fue identificada y depositada con el No. de Depósito NRRL-50452, 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 *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452, 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 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 *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452 de la presente invención puede ser formulada o mezclada para preparar gránulos,

polvos o suspensiones líquidas. Estas pueden ser incorporadas directamente en 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.

5 El equipo y los procedimientos para dichas aplicaciones son conocidos en la técnica y utilizados en varias empresas agrícolas. De manera regular, se aplican entre 1 a 50 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
10 puede ser ajustada proporcionalmente a una mayor o menor cantidad de unidades formadoras de colonias. Una cantidad adecuada de 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
15 de *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452 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 están creciendo en los mismos.

20 Los polvos secos que contienen la cepa de *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452 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 formadoras de colonia por gramo.

Las suspensiones líquidas antes mencionadas pueden ser preparadas para aplicarse en los surcos de cultivo. Tales materiales
5 pueden ser agregados a los surcos en donde las semillas son plantadas o donde se transplantan las plántulas. Los equipos para realizar dichas aplicaciones son ampliamente utilizados en la industria agrícola. Las cantidades típicas para aplicación son entre 1 y 170 kg de producto (10^6 a 10^{11} ufc/g) por hectárea de cultivo.

10 Los gránulos pueden ser aplicados a la superficie del suelo que contengan plantas en crecimiento, al suelo al momento del cultivo o en suelos en donde las semillas o las plántulas van a ser plantados. Las cantidades típicas para las aplicaciones van de 1 a 1000 kg de producto (10^6 a 10^{11} ufc/g) por hectárea de cultivo. Adicionalmente, se
15 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 Myths of Biocontrol. Changes in Perceptions Based on
20 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 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
5 *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452 es aplicable directamente a las
semillas, utilizando cualquier método de tratamiento de semillas
conocido en el 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
10 *Trichoderma hamatum* Applied to Seeds As a Biocontrol Agent,"
Phytopathology 71: 569-572 (1981); Taylor et al., "Concepts and
Technologies of Selected Seed 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
15 misma).

Procedimiento de aplicación de las cepas

Para aplicar la cepa de *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452, ya
sea sola o como parte de la composición antes descrita, se pueden
20 preinocular las semillas de chile 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 *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452 ya sea sola o como parte de la formulación antes descrita directamente en la raíz de plantas de Chile. La cepa puede aplicarse como gránulos, polvo o solución líquida sobre
5 el suelo del cultivo.

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

La cepa de *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452 de la presente
10 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 hongos o bacterias en plantas solanáceas, de manera notable y no obvia en comparación tanto con otras cepas
15 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
20 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

Ensayo de confrontación de la cepa de *T. citrinoviride* NRRL-50452 vs. Fitopatógenos.

5 Se realizaron ensayos de confrontación de las diferentes cepas de *Trichoderma* aisladas contra los 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 *Alternaria solani*. En la Figura 1 se muestran

10 resultados representativos de los experimentos de ensayos duales o de confrontación. Así, el hongo descrito y reclamado en la presente invención, a saber, *T. citrinoviride* NRRL-50452 y los de la colección de cepas de *Trichoderma atroviride* IMI206040, *Trichoderma virens* GV29.8 fueron confrontados contra los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* (Fo),

15 *Phytophthora capsici* (Pc), *Rhizoctonia solani* (Rs) y *Sclerotium cepivorum* (Sc) 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

20 los aislados de los 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. citrinoviride* NRRL-50452 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
5 confrontado, en comparación con las cepas de referencia o comerciales, por lo que la cepa de *T. citrinoviride* NRRL-50452 supera ampliamente a las cepas comerciales y de referencia existentes.

Ejemplo 2

10 Ensayo de antibiosis de la cepa de *T. citrinoviride* NRRL-50452 vs. Fitopatógenos.

También se realizaron pruebas de antibiosis de las cepas de *Trichoderma* contra los fitopatógenos que se mencionaron en las pruebas de confrontación. Como se puede observar en la figura 2, la
15 cepa de referencia *T. virens* Gv29-8 fue capaz de inhibir el crecimiento de *R. solani*, *S. cepivorum*, 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. citrinoviride* NRRL-50452 aunque no inhibió el crecimiento de manera tan efectiva
20 como lo hizo la cepa de *T. atroviride* o *T. harzianum*, fue seleccionada porque 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. citrinoviride* NRRL-50452 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.

Ejemplo 3

Generación de inóculo de la cepa de *T. citrinoviride* NRRL-50452 en granos de trigo y arroz.

Se realizaron experimentos para la generación del inóculo de la especie de *T. citrinoviride* NRRL-50452 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. citrinoviride* NRRL-50452. Para trigo las UFC fue de 2.5×10^9 para *T. citrinoviride* NRRL-50452. 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. citrinoviride* NRRL-50452 por cada 100 g de sustrato. Se incuba 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 in vitro de los filtrados de cultivos en medio líquido de la cepa de *T. citrinoviride* NRRL-50452.

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*, 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 *Rhizoctonia 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 almacigo de plántulas de chile a aproximadamente 30 días después de haberse sembrado, 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 procesamiento, el cual, consistió en lavar perfectamente la raíz para posteriormente pesar la planta en una balanza analítica y sacar el peso fresco (Figura 3). Inmediatamente después se introdujeron en 5 bolsas de papel de estraza y se colocaron en una estufa a 70°C por 72 h. Transcurrido este tiempo se sacaron las muestras de la estufa y se 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 10 y comparación de medias, Tukey ($p < 0.5$), con los datos de peso fresco y peso seco.

También se evaluó in vitro el efecto de los filtrados de cultivos en medio líquido (purificación parcial de las moléculas promotoras del 15 crecimiento) en medio mínimo de *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452 en plántulas de Chile, (Figura 5). Las diluciones en el caso de la cepa de *Trichoderma* fue de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 complementado con 1X de medio mínimo. El experimento consistió en poner a crecer en medio mínimo líquido la cepa por 15 días a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, sin agitación. Después 20 de este tiempo se procedió a filtrar los medios para dejarlos libres de células. Para lo cual se utilizaron dispositivos con filtros de 0.25μ de tamaño de poro. Una vez que se tenía el medio libre de células se

prepararon cajas de Petri con las respectivas diluciones. En estas cajas se colocaron 4 semillas de chile germinadas con una radícula de aproximadamente 0.5 cm. Se dejaron crecer en estas cajas por 25 días al cabo de los cuales se procedió a pesarlas para determinar el peso fresco. Se colocaron en una estufa a 70°C durante 72 hrs y se determinó el peso seco. Con los datos de peso fresco (Figura 5) y peso seco (Figura 6) se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.5$) (Figuras 5 y 6).

En el peso fresco se puede observar que estadísticamente se separan algunos tratamientos en donde se aprecia un efecto negativo en la promoción del crecimiento respecto al control absoluto (medio mínimo), tal es el caso de la dilución de 1/2 de *T. citrinoviride* NRRL-50452 (Tc1/2). Podemos observar también que a medida que se diluye la concentración de los filtrados se incrementa el peso fresco de las plántulas como se observa en el tratamiento de Tc1/16. En este tratamiento se observa que los filtrados estimulan el aumento en la biomasa de las plántulas. Estos datos coincidieron con el peso seco, lo que nos indica el incremento en la biomasa (Figura 6). El comportamiento de los tratamientos es muy similar en el caso del peso seco, los diferentes tratamientos muestran diferencias estadísticas significativas Tukey ($p \leq 0.5$) donde se aprecia el efecto ya sea positivo en el estímulo del crecimiento como en el caso de Tc1/16 en el que

estadísticamente se separa de los demás tratamientos reflejando un efecto en la promoción del crecimiento, pero por otro lado el mismo filtrado más concentrado actúa como un regulador negativo Tc1/2, comparando con el control absoluto (ms).

5 **Ejemplo 5**

Evaluación de la efectividad biológica de la cepa de *T. citrinoviride* NRRL-50452 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: CABS Testigo absoluto, TCA *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452, TvG42, cepa de laboratorio de *Trichoderma virens*, Th22 cepa comercial de *Trichoderma 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. citrinoviride* NRRL-50452 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 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.

En el primer muestreo (Figura 7) podemos apreciar que existe un bajo porcentaje de plantas enfermas siendo el tratamiento control absoluto (CABS) donde se observó el mayor porcentaje (8%) de plantas con síntomas de enfermedad. Mientras que en los tratamientos con TvG42 y Th22, el porcentaje de plantas enfermas no fue mayor del 3%. 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 plantas enfermas por surco para determinar el porcentaje de plantas enfermas.

En este muestreo (Figura 8) observamos que en los tratamientos donde se inocularon las diferentes cepas de *Trichoderma* el porcentaje de plantas enfermas fue menor comparado con el porcentaje de daño que se tenía en tratamientos como el control absoluto (T) o el tratamiento químico convencional (CQ). En este último el porcentaje de daño era superior al 12 % mientras que en tratamientos como C22 (cepa de nuestro laboratorio) el porcentaje de plantas enfermas fue cercano al 4%. Para las plantas tratadas con la cepa Tc NRRL-50452 el daño fue menor a 3.5% comparando Vs. CQ con una diferencia de más del 8%, en condiciones de campo resulta ser importante, ya que esto puede llegar a reflejarse en el mejor de los casos en rendimiento.

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 suelos con antecedentes de pérdidas severas de cultivos causadas por enfermedades radiculares, como es el caso del lote donde se realizaron los experimentos. El lote que se destino 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. Por lo anterior se realizó una tercera aplicación al inicio de las primeras

detecciones de los problemas de "secadera", esta aplicación se realizó 8 días después de la segunda aplicación para incrementar el inoculo de las distintas cepas de *Trichoderma* en campo.

En la tercera evaluación del daño causado por el complejo de organismos que conforman la "secadera" encontramos que en 5 tratamientos como Tc NRRL-50452 proporciona una buena protección, pese a las condiciones climáticas, el daño apenas llegó al 20%, mientras que en el T o el CQ el porcentaje de daño alcanzó más del 50% (Figura 9). Otras cepas con buen comportamiento de protección 10 a plantas de Chile en campo fue la C22 con el 40% de daño respectivamente. A estas fechas y en otro tipo de condiciones durante el ciclo agrícola anterior ya se había perdido más del 90% de las plantas.

De los experimentos anteriores, se destaca ampliamente el 15 excelente comportamiento en campo de la cepa de *T. citrinoviride* NRRL-50452 de la presente invención, ya que se logró proteger hasta un 80% de 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 utilidad de la cepa de la presente 20 invención y de su comportamiento notable e inesperado sobre las cepas comerciales existentes que fueron incapaces de conferir una

protección medianamente cercana a la protección de la cepa de *T. citrinoviride* NRRL-50452.

Ejemplo 7

Evaluación del rendimiento de chile post-tratamiento.

5 Para evaluar el rendimiento, al tiempo del corte, se cuantificaron las cajas de chile que se cortaron en cada uno de los surcos. Estas en promedio pesaron 12.7 kg, para este trabajo se tomó en cuenta el rendimiento total de cada surco. Este se saco de la suma de los dos cortes que les dio en la parcela de estudio.

10 El análisis de los datos se hizo con el paquete estadístico de SAS para Windows V8. Se hizo un análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

Como se muestra en la figura 10, al hacer la comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) del rendimiento promedio por surco, estadísticamente se separan del control (T), los tratamientos como TCA con un promedio por surco de casi 250 kg de chile, casi 100 kg más que el tratamiento control (T) o que el que se le dio manejo químico convencional (CQ). En los tratamientos con la cepa de *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452, hay diferencia en cuanto al rendimiento en algunos casos de más de 50 kg. Lo cual bajo la visión del productor si consideramos que por hectárea hay entre 70 y 80 surcos estamos hablando de una diferencia de más de 3 toneladas de producto.

15

20

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 los dibujos
5 acompañantes deben interpretarse como ilustrativos y no en un sentido limitante.

NOVEDAD DE LA INVENCION**REIVINDICACIONES**

1.- Una cepa de *Trichoderma citrinoviride*, con número de
5 acceso NRRL-50452.

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

3.- La cepa de conformidad con cualquiera de las
10 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 *Trichoderma citrinoviride* NRRL-50452 como la que se
reclama en la reivindicación 1, a una planta, plántula, semilla de
15 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.

5.- El método de conformidad con la reivindicación 5,
caracterizado además porque dicha aplicación es llevada a cabo en
20 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.

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 planta solanácea es chile.

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

10.- La formulación agronómica de conformidad con la 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 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 citrinoviride* NRRL-50452, capaz de promover el crecimiento y la resistencia a fitopatógenos en plantas de interés agronómico de una manera muy superior en comparación con las cepas comerciales existentes hoy en día. 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.

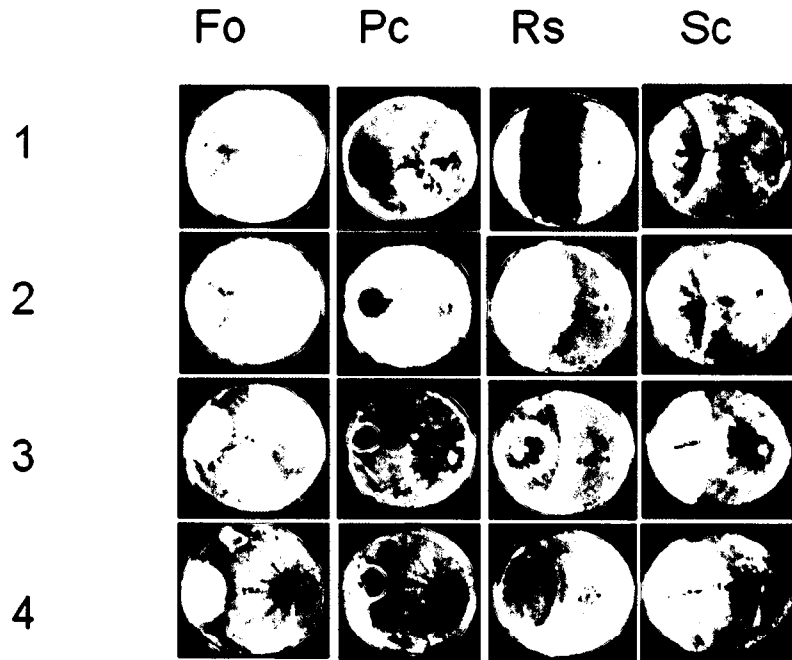


FIGURA 1

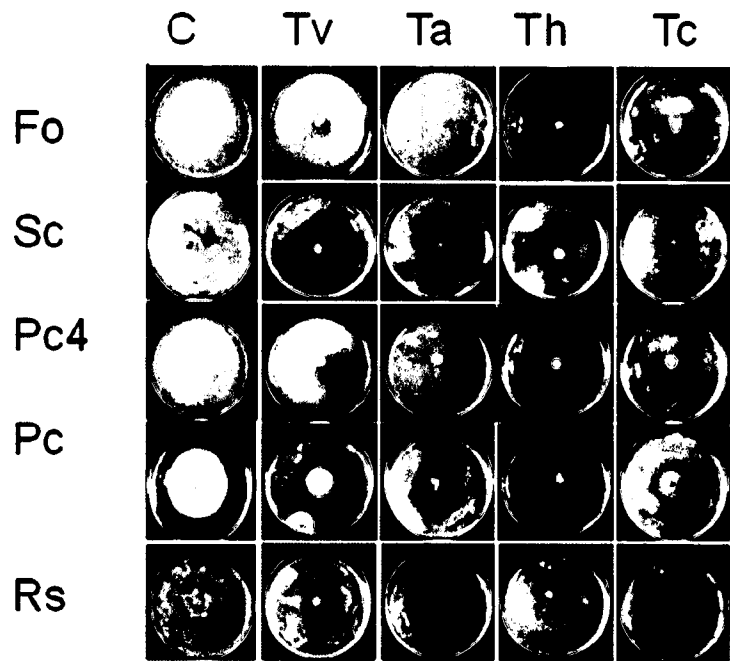


FIGURA 2

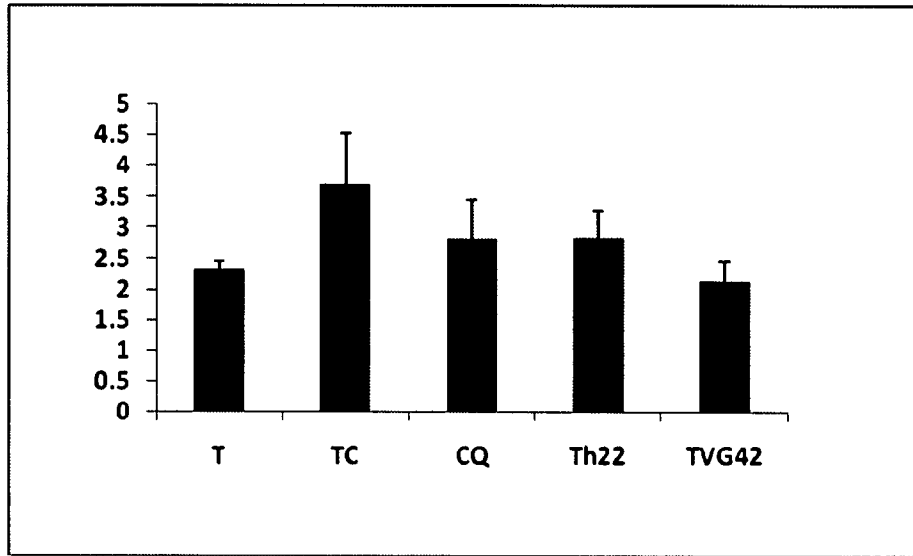


FIGURA 3

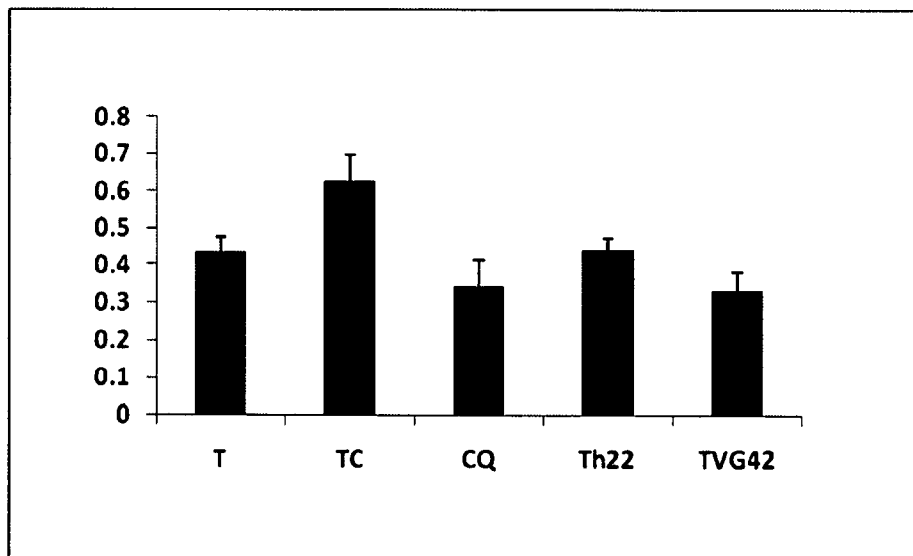


FIGURA 4

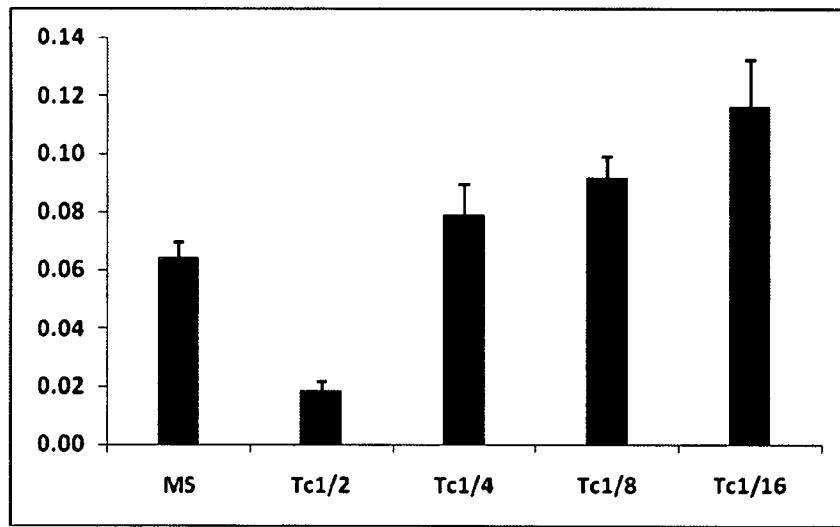


FIGURA 5

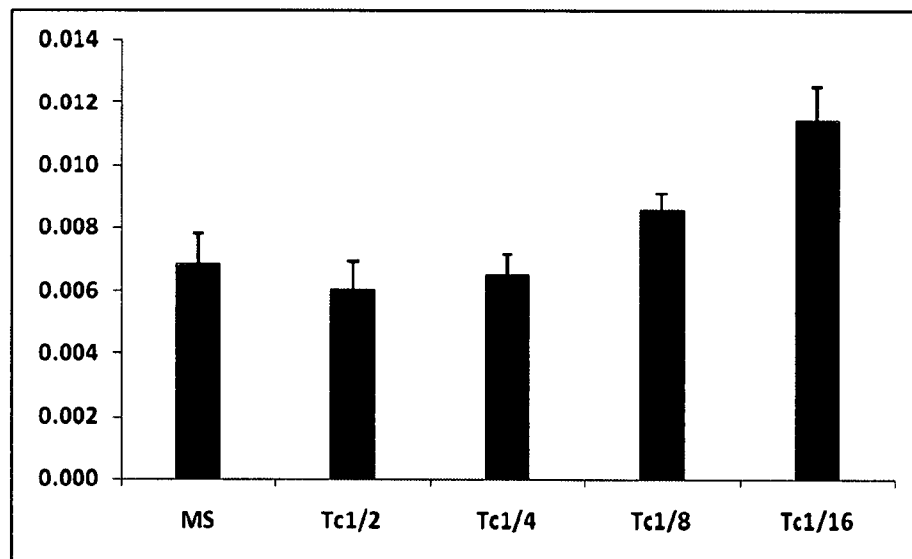


FIGURA 6

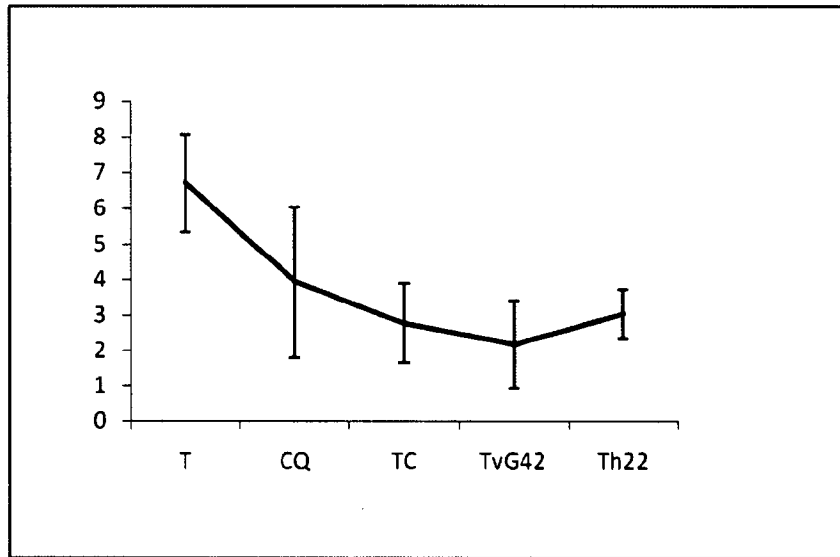


FIGURA 7

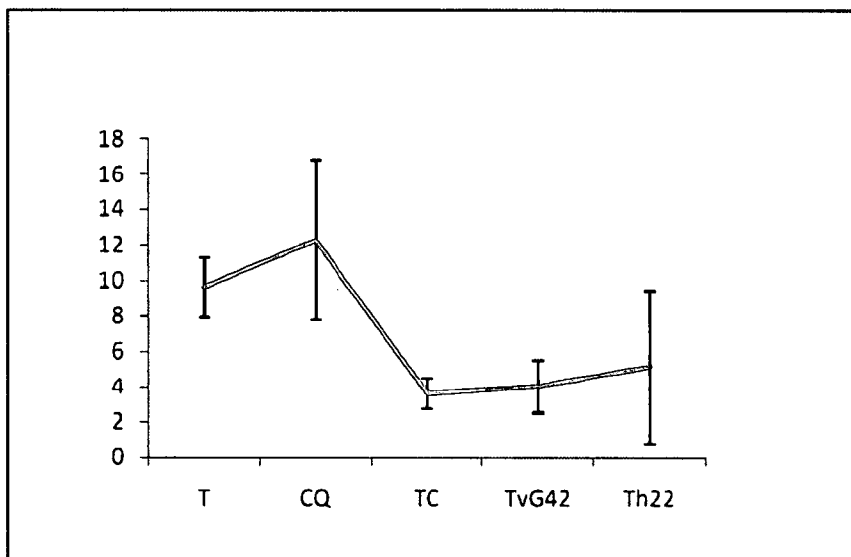


FIGURA 8

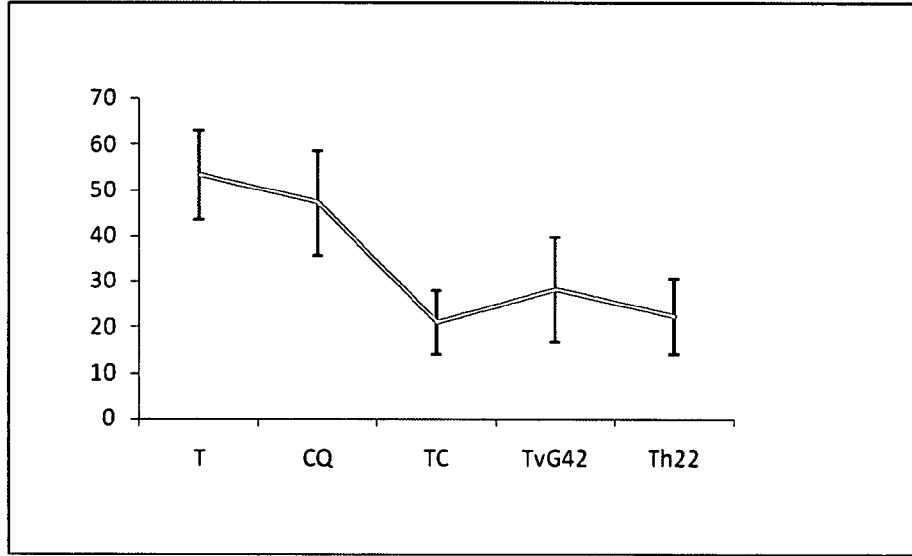


FIGURA 9

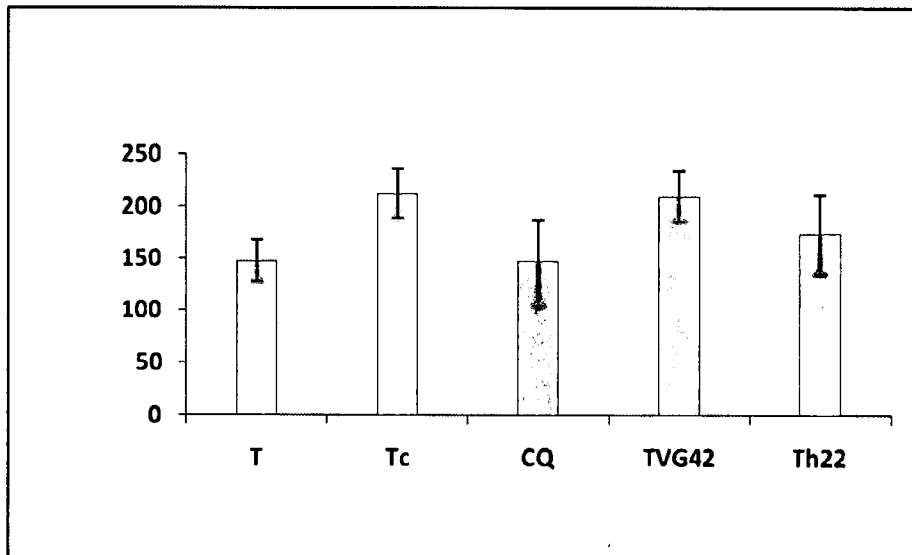


FIGURA 10