

(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **26/10/2009** (51) Int. Cl: **C12N 15/00** (2006.01)
(22) Fecha de presentación: **25/04/2008**
(21) Número de solicitud: **2008005371**

(71) Solicitante:
**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACION
CIENTIFICA Y TECNOLOGICA, A.C.
Camino a la Presa San José 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
GERARDO RAFAEL ARGÜELLO ASTORGA
MIGUEL ÁNGEL SALAS MARINA**

(74) Representante:
**NORMA ISABEL GARCÍA CALDERÓN
Prolongación Corregidora Norte 1088 planta baja
QUERETARO Queretaro 76140 MX**

(54) Título: **CEPAS TRANSFORMANTES DEL HONGO MICOPARASITO TRICHODERMA SPP. PROMOTORAS DE CRECIMIENTO Y RESISTENCIA A ENFERMEDADES FUNGICAS Y BACTERIANAS EN PLANTAS SOLANACEAS, COMPOSICIONES QUE LAS CONTIENEN, PROCEDIMIENTO DE APLICACION Y USO DE LAS MISMAS.**

(54) Title: **TRANSFORMANT STRAINS OF THE MYCOPARASITE FUNGUS TRICHODERMA SPP , WHICH PROMOTE THE GROWTH AND RESISTANCE TO FUNGAL AND BACTERIAL DISEASES IN SOLANACEAE PLANTS, COMPOSITION CONTAINING THE SAME, APPLICATION PROCESS AND USE THEREOF.**

(57) Resumen

La presente invención describe y reclama cepas transformantes novedosas del hongo *Trichoderma ssp.*, capaces de promover el crecimiento y la resistencia a fitopatógenos en plantas de interés agronómico de una manera significativa en comparación con las cepas convencionales. La utilización de estas cepas disminuyen 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 novel transformant strains of the *Trichoderma ssp* fungus, which promote the growth and resistance to phytopathogens in plants of agricultural interests in a significant manner unlike traditional strains. The use of said strains reduces in a substantial manner the application of manures and chemical pesticides which manufacture and usage damage the environment and human health.

Cepas transformantes del hongo micoparásito *Trichoderma* Spp. promotoras de crecimiento y resistencia a enfermedades fúngicas y bacterianas en plantas solanáceas, composiciones que las contienen, procedimiento de aplicación y uso de las mismas.

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo de la agrobiotecnología, dado que describe y reclama cepas transformantes del hongo *Trichoderma* spp. capaces de promover el crecimiento y la 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 salud de los humanos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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 elicitors 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.

Ahora bien, existen dos reportes en la literatura relacionados parcialmente con la presente invención, los cuales se remiten en la presente como antecedentes, mas no representan arte previo sobre la misma. Por un
5 lado, el artículo de Djonovic, S., *et al* (Djonovic, S, *et al*, 2006, MPMI Vol. 19, No. 8, pp 838-853) relacionado con la identificación, purificación y caracterización del gen SM1 de *Trichoderma virens* en donde se describe el papel de SM1 en la inducción de resistencia en plantas por este organismo a través de la activación de mecanismos de defensa en algodón y arroz, en
10 donde los experimentos fueron llevados a cabo en sistemas de hidroponía. Adicionalmente los autores describen la expresión basal de SM1 y la inducción de este gen cuando se pone en contacto con plantas de algodón. Sin embargo, dicho reporte no describe el uso de cepas específicas de *Trichoderma* que sobreexpresen la proteína SM1 durante la interacción con
15 plantas solanáceas, ni el efecto en el crecimiento de dichas plantas, por lo que no constituye arte previo para la presente invención.

Por otro lado, el reporte de Djonovic, S, *et al* (Djonovic, S., *et al*, Sep 2007, Plant Physiology Preview), describe que la proteína sm1 induce la
20 resistencia sistémica en maíz, en donde una vez más no es evidente ni se describe el doble efecto promotor de crecimiento y defensa contra fitopatógenos ni en maíz, ni en plantas solanáceas.

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
5 cepa del hongo micoparásito *Trichoderma harzianum* T-315 (ATCC No. 20671), la cual es capaz de controlar a los hongos fitopatógenos del genero *Phytium*, *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
10 fitopatógenos del suelo. A diferencia de la patente en cuestión, el presente invento se desarrollaron cepas transformantes de los hongos *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma virens*, que sobreexpresan al gen *SM1*, las cuales son capaces de promover el crecimiento de manera significativa en comparación con las cepas parentales y de proteger a las plantas de hongos
15 y bacterias fitopatógenos mediante la inducción del sistema de defensa de estas, sin entrar en contacto con los hongos fitopatógenos.

La patente de los Estados Unidos 6,242,420, trata sobre una proteína elicitora del sistema de defensa a enfermedades en plantas del hongo
20 *Trichoderma virens*. Describen el uso de esta proteína para el tratamiento o prevención de infecciones provocadas por hongos en plantas. Esta proteína debe producirse en cultivo por el hongo para posteriormente ser recobrada del medio de cultivo y purificarla para su aplicación en la prevención y tratamiento

de enfermedades fúngicas en plantas. A diferencia de la patente mencionada, en el presente trabajo planteamos el utilizar organismos genéticamente modificados que sobreproducen a la proteína en cuestión. En el presente invento no planteamos purificar la proteína de cultivos del hongo, sino
5 sobreproducirla en los hongos y ponerlos a interactuar con las plantas *in vivo*. Es importante mencionar que en la patente citada aún no conocían a la proteína completa.

La patente de los Estados Unidos 6,475,772, presenta una cepa del
10 hongo *Trichoderma harzianum* para ser utilizada como un inhibidor del crecimiento de nemátodos, como fungicida, como promotor del crecimiento de plantas y los procesos para el aislamiento de estas, el cual se basa en la utilización del mutágeno químico Etil Metano Sulfonato. El presente trabajo se diferencia de la patente 6,475,772 de los Estados Unidos, en que las cepas
15 generadas en la presente invención son transformantes para sobreexpresar el gen *SM1* y las descritas en la patente 6,475,772 son mutantes con Etil Metano Sulfonato. Aunque en ambos trabajos se plantea el utilizarlas para controlar enfermedades fúngicas y la promoción del crecimiento de plantas, estos son completamente distintos en la forma de generarlas e incluso se utilizan cepas
20 diferentes del género *Trichoderma*. Adicionalmente, las cepas transformantes de la presente invención protegen de manera inesperada contra bacterias fitopatógenas.

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
5 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
10 en el presente invento se desarrollaron cepas transformantes de los hongos *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma virens*, que sobreexpresan al gen *SM1*, las cuales son capaces de promover el crecimiento y de proteger a la planta de bacterias y hongos fitopatógenos de manera significativa en comparación con las cepas parentales mediante la inducción del sistema de defensa de
15 estas.

En vista de los antecedentes de la invención, el problema técnico que se resuelve es la descripción, uso y procedimiento de aplicación de cepas específicas de *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride* capaces tanto de
20 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. Esto queda comprobado con los ensayos de

promoción del crecimiento y de defensa contra hongos fitopatógenos y bacterias, mismos que demostraron que las cepas generadas superan significativamente a las cepas parentales.

5 Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra el efecto de las cepas de *Trichoderma atroviride* transformantes sobre el crecimiento de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). En el carril 1 se muestra el crecimiento en centímetros de la
10 planta de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) sin *Trichoderma*; en el carril 2 se ve el crecimiento en centímetros de la planta de jitomate inoculada con la cepa silvestre de *Trichoderma atroviride*; en el carril 3 se muestra el crecimiento de jitomate en centímetros inoculado con la cepa de *Trichoderma atroviride* SE1.1; en el carril 4 se muestra el crecimiento en centímetros de
15 jitomate con la cepa de *Trichoderma atroviride* depositada con el número de acceso NRRL 50089; en el carril 5 se ve el crecimiento en centímetros de una planta de jitomate inoculada con la cepa SE3.1 de *Trichoderma atroviride*.

La Figura 2 muestra el efecto de las cepas de *Trichoderma virens*
20 transformantes sobre el crecimiento de plantas de jitomate. En el carril 1 se muestra el crecimiento en centímetros de la planta de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) sin *Trichoderma*; en el carril 2 se ve el crecimiento en centímetros de la planta de jitomate inoculada con la cepa silvestre de *Trichoderma virens*;

en el carril 3 se muestra el crecimiento de jitomate en centímetros inoculado con la cepa de *Trichoderma virens* SE2.1; en el carril 4 se muestra el crecimiento en centímetros de jitomate con la cepa de *Trichoderma virens* depositada con el número de acceso NRRL 50088; en el carril 5 se ve el crecimiento en centímetros de una planta de jitomate inoculada con la cepa SE6.2 de *Trichoderma virens*.

La figura 3 muestra el efecto de las cepas de *Trichoderma atroviride* transformantes sobre el crecimiento de plantas de chile (*Capsicum annum*). En el carril 1 se muestra el crecimiento en centímetros de la planta de chile (*Capsicum annum*) sin *Trichoderma*; en el carril 2 se ve el crecimiento en centímetros de la planta de chile inoculada con la cepa silvestre de *Trichoderma atroviride*; en el carril 3 se muestra el crecimiento de chile en centímetros inoculado con la cepa de *Trichoderma atroviride* SE1.1; en el carril 4 se muestra el crecimiento en centímetros de chile con la cepa de *Trichoderma atroviride* depositada con el número de acceso NRRL 50089; en el carril 5 se ve el crecimiento en centímetros de una planta de chile inoculada con la cepa SE3.1 de *Trichoderma atroviride*.

La figura 4 muestra el efecto de las cepas de *Trichoderma virens* transformantes sobre el crecimiento de plantas de chile (*Capsicum annum*). En el carril 1 se muestra el crecimiento en centímetros de la planta de chile (*Capsicum annum*) sin *Trichoderma*; en el carril 2 se ve el crecimiento en

centímetros de la planta de chile inoculada con la cepa silvestre de *Trichoderma virens*; en el carril 3 se muestra el crecimiento de chile en centímetros inoculado con la cepa de *Trichoderma virens* SE2.1; en el carril 4 se muestra el crecimiento en centímetros de chile con la cepa de *Trichoderma*
5 *virens* depositada con el número de acceso NRRL 50088; en el carril 5 se ve el crecimiento en centímetros de una planta de chile inoculada con la cepa SE6.2 de *Trichoderma virens*.

La figura 5 muestra el efecto de las cepas *Trichoderma atroviride*
10 transformantes contra la acción de hongos fitopatógenos en plantas de jitomate. En el carril 1 se muestra el porcentaje de daño foliar de la planta de jitomate sin fitopatógeno y sin inóculo de *Trichoderma*; en el carril 2 se muestra el porcentaje de daño foliar de jitomate inoculado con el hongo fitopatógeno *Alternaria solani* (As) y sin inóculo de *Trichoderma*; en el carril 3
15 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de jitomate inoculadas con el hongo fitopatógeno *Alternaria solani* (As) y la cepa silvestre de *Trichoderma atroviride*; en el carril 4 se muestra el porcentaje de daño foliar de plantas de jitomate inoculadas con el hongo fitopatógeno *Alternaria solani* (As) y la cepa SE1.1 de *Trichoderma atroviride*; en el carril 5 se muestra el porcentaje de
20 daño foliar en plantas de jitomate inoculadas con el hongo fitopatógeno *Alternaria solani* (As) y la cepa de *Trichoderma atroviride* depositada con el número de acceso NRRL 50089; en el carril 6 se muestra el porcentaje de

daño foliar en plantas de jitomate inoculadas con el hongo fitopatógeno *Alternaria solani* (As) y la cepa SE3.1 de *Trichoderma atroviride*.

La figura 6 muestra el efecto de las cepas *Trichoderma virens*
5 transformantes contra la acción de hongos fitopatógenos en plantas de
jitomate. En el carril 1 se muestra el porcentaje de daño foliar de la planta de
jitomate sin fitopatógeno y sin inóculo de *Trichoderma*; en el carril 2 se
muestra el porcentaje de daño foliar de jitomate inoculado con el hongo
fitopatógeno *Alternaria solani* (As) y sin inóculo de *Trichoderma*; en el carril 3
10 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de jitomate inoculadas con
el hongo fitopatógeno *Alternaria solani* (As) y la cepa silvestre de *Trichoderma*
virens; en el carril 4 se muestra el porcentaje de daño foliar de plantas de
jitomate inoculadas con el hongo fitopatógeno *Alternaria solani* (As) y la cepa
SE2.1 de *Trichoderma virens*; en el carril 5 se muestra el porcentaje de daño
15 foliar en plantas de jitomate inoculadas con el hongo fitopatógeno *Alternaria*
solani (As) y la cepa de *Trichoderma virens* depositada con el número de
acceso NRRL 50088.

La figura 7 muestra el efecto de las cepas *Trichoderma atroviride*
20 transformantes contra la acción de hongos fitopatógenos en plantas de chile.
En el carril 1 se muestra el porcentaje de daño foliar de la planta de chile sin
fitopatógeno y sin inóculo de *Trichoderma*; en el carril 2 se muestra el
porcentaje de daño foliar en plantas de chile inoculadas con el hongo

fitopatígeno *Alternaria solani* (As) y sin inóculo de *Trichoderma*; en el carril 3 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de chile inoculadas con el hongo fitopatígeno *Alternaria solani* (As) y la cepa silvestre de *Trichoderma atroviride*; en el carril 4 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de chile inoculadas con el hongo fitopatígeno *Alternaria solani* (As) y la cepa SE1.1 de *Trichoderma atroviride*; en el carril 5 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de chile inoculadas con el hongo fitopatígeno *Alternaria solani* (As) y la cepa de *Trichoderma atroviride* depositada con el número de acceso NRRL 50089; en el carril 6 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de chile inoculadas con el hongo fitopatígeno *Alternaria solani* (As) y la cepa SE3.1 de *Trichoderma atroviride*.

La figura 8 muestra el efecto de las cepas *Trichoderma virens* transformantes contra la acción de hongos fitopatógenos en plantas de chile. En el carril 1 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de chile sin fitopatígeno y sin inóculo de *Trichoderma*; en el carril 2 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de chile inoculadas con el hongo fitopatígeno *Alternaria solani* (As) y sin inóculo de *Trichoderma*; en el carril 3 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de chile inoculadas con el hongo fitopatígeno *Alternaria solani* (As) y la cepa silvestre de *Trichoderma virens*; en el carril 4 se muestra el porcentaje de daño foliar de plantas de chile inoculadas con el hongo fitopatígeno *Alternaria solani* (As) y la cepa SE2.1 de *Trichoderma virens*; en el carril 5 se muestra el porcentaje de daño foliar en

plantas de chile inoculadas con el hongo fitopatógono *Alternaria solani* (As) y la cepa de *Trichoderma virens* depositada con el número de acceso NRRL 50088; en el carril 6 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de chile inoculadas con el hongo fitopatógono *Alternaria solani* (As) y la cepa SE6.2 de *Trichoderma virens*.

La figura 9 muestra plantas de jitomate inoculadas con *Trichoderma virens* transformantes confrontadas con la bacteria fitopatógona *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. En el carril 1 se muestra el porcentaje de daño foliar de la planta de jitomate sin fitopatógono y sin inóculo de *Trichoderma*; en el carril 2 se muestra el porcentaje de daño foliar de jitomate inoculado con la bacteria fitopatógona *Pseudomonas syringae* pv *tomato* y sin inóculo de *Trichoderma*; en el carril 3 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de jitomate inoculadas con la bacteria fitopatógona *Pseudomonas syringae* pv *tomato* y la cepa silvestre de *Trichoderma virens*; en el carril 4 se muestra el porcentaje de daño foliar de plantas de jitomate inoculadas con la bacteria fitopatógona *Pseudomonas syringae* pv *tomato* y la cepa SE2.1 de *Trichoderma virens*; en el carril 5 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de jitomate inoculadas con la bacteria fitopatógona *Pseudomonas syringae* pv *tomato* y la cepa de *Trichoderma virens* depositada con el número de acceso NRRL 50088; en el carril 6 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de jitomate inoculadas con la bacteria fitopatógona *Pseudomonas syringae* pv *tomato* y la cepa SE6.2 de *Trichoderma virens*.

La figura 10 muestra plantas de jitomate inoculadas con *Trichoderma atroviride* transformantes confrontadas con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. En el carril 1 se muestra el porcentaje de daño foliar de la planta de jitomate sin fitopatógeno y sin inóculo de *Trichoderma*; en el carril 2 se muestra el porcentaje de daño foliar de jitomate inoculado con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv *tomato* y sin inóculo de *Trichoderma*; en el carril 3 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de jitomate inoculadas con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv *tomato* y la cepa silvestre de *Trichoderma atroviride*; en el carril 4 se muestra el porcentaje de daño foliar de plantas de jitomate inoculadas con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv *tomato* y la cepa SE1.1 de *Trichoderma atroviride*; en el carril 5 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de jitomate inoculadas con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv *tomato* y la cepa de *Trichoderma atroviride* depositada con el número de acceso NRRL 50089; en el carril 6 se muestra el porcentaje de daño foliar en plantas de jitomate inoculadas con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv *tomato* y la cepa SE3.1 de *Trichoderma atroviride*.

20 **BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION**

En un primer aspecto, la presente invención reclama y describe dos cepas de referencia del género *Trichoderma*: *Trichoderma atroviride* (IMI

206040) y *Trichoderma virens* (Gv29-8) transformadas, mismas que fueron generadas por el método de transformación de protoplastos, utilizando una construcción genética que se desarrolló sobre el vector de expresión pGFP-Hyg (Casas-Flores et al. 2004 *Microbiology*, **150**: 3561-3569) el cual transcribe los genes clonados bajo el control del promotor *pki* del gen que codifica para la Piruvato Cinasa (Zeilinger, S et al., 1999. *Fungal Genetics and Biology*. 26: 131-140). Los genes *SM1* que codifican para la proteína *sm1* elicitadora de la respuesta de defensa en plantas de cada una de las dos especies, fueron amplificados por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR y clonados en el vector de expresión pGFP-Hyg, para posteriormente transformar a ambos hongos por el método antes mencionado, seleccionando colonias resistentes a higromicina y así obtener cepas transformantes sobreexpresantes estables del gen *SM1*.

Por lo tanto, y para efectos de la presente invención, se entenderá que el término “cepa transformante” se refiere a las cepas obtenidas de acuerdo a la metodología descrita en el párrafo anterior y en la descripción detallada de la invención suscrito posteriormente, que sobreexpresan de manera estable al menos una copia del gen *SM1*.

Otro objetivo de la presente invención es describir una formulación agronómica que comprende cada una de las cepas obtenidas anteriormente, junto con los vehículos agronómicamente aceptables para su aplicación a cultivos de plantas solanáceas para promover el crecimiento y conferir resistencia a fitopatógenos.

Un objetivo adicional de la presente invención es describir y reclamar el uso de las cepas, solas o como parte de una formulación agronómica para promover el crecimiento y conferir resistencia a fitopatógenos, tanto hongos como bacterias, en plantas solanáceas, preferiblemente de jitomate y chile.

Descripción detallada de la invención

Generación de las cepas

10

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes *SM1* de los hongos micoparásitos *Trichoderma atroviride* (IMI 206040) y *T. virens* (Gv29-8). A los oligonucleótidos sentido se les agregó un sitio *Xba* I y a los reversos se les agregó un sitio de restricción *Nsi* I, con la finalidad de dirigir la clonación del gen *SM1* bajo el control del promotor *pki* del gen que codifica para la Piruvato cinasa (Zeilinger, S et al., 1999. Fungal Genetics and Biology. 26: 131-140) y del terminador *cbh2* del gen que codifica para la Celobiohidrolasa II (Zeilinger, S et al., 1999. Fungal Genetics and Biology. 26: 131-140) del hongo filamentoso *Trichoderma reesei*. Con los dos pares de oligonucleótidos se amplificaron por PCR ambos genes y se sometieron por separado a una doble digestión con las enzimas de restricción *Xba* I y *Nsi* I, al igual que el vector de expresión pGFP-Hyg por métodos convencionales (Sambrook y Russell, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold

Spring Harbor Laboratory Press). Posteriormente se procedió a ligar el fragmento en el vector por métodos estandares ya descritos (Sambrook y Russell, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). La manipulación genética y la propagación de los plásmidos se llevaron a cabo en la cepa de *E. coli* TOP10F' y se extrajo el plásmido para transformar cada una de las cepas de *Trichoderma* spp. con su respectivo gen en sentido. Para la generación de protoplastos las cepas de *Trichoderma* fueron incubadas en un medio osmótico con enzimas líticas. Una vez obtenidos los protoplastos se procedió a transformar a estos con 20 µg de DNA de las construcciones antes mencionadas, se sembraron en agar suave y este en medio de selección con higromicina y se incubaron a una temperatura de 24°C a 30°C por 24 a 96 horas, para posteriormente aislar las transformantes y realizar siembras consecutivas en medio selectivo hasta obtener cultivos monoespóricos estables (Casas-Flores et al. 2004 *Microbiology*. **150**: 3561-3569).

Deposito de las cepas:

A partir de la generación de las cepas antes descrita, se seleccionaron dos cepas transformantes altamente efectivas y competentes: SE2.1 de *T. atroviride* y SE2.2 de *T. virens*, las cuales fueron depositadas de acuerdo a lo siguiente:

Las siguientes cepas de *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma virens* han sido depositadas bajo los términos del Tratado de Budapest, en el Agricultural Research Service Culture Collection (ARS Patent Cultura Collection, 1815 North University St, Peoria, IL, 61604, Estados Unidos de Norteamérica). Los números de acceso indicados se asignaron después de la verificación de la viabilidad de las cepas, y se han pagado los impuestos de requisición. El acceso a dichas cepas será posible durante el trámite de la solicitud de patente. Todas las restricciones sobre la disponibilidad de dichas cepas al público se removerán irrevocablemente una vez que se acepte la patente basándose en la solicitud. Además, los depósitos designados se mantendrán 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 las cepas se vuelven no viables o inadvertidamente son destruidas, serán reemplazadas con cepas viables. Así, las cepas descritas y reclamadas en la presente invención, corresponden a lo mostrado en la siguiente tabla:

Nombre de la cepa	Fecha de Depósito	Número NRRL
SE2.1 <i>Trichoderma atroviride</i>	7 de diciembre de 2007	NRRL 50089
SE2.2 <i>Trichoderma virens</i>	7 de diciembre de 2007	NRRL 50088

20

Formulaciones que contienen las cepas transformantes de *T. atroviride* y *T. virens* y métodos de aplicación.

Una vez que las cepas transformantes ya han sido identificadas y depositadas de acuerdo a lo anterior, se crecen 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 las cepas transformantes de *Trichoderma*, *T. virens* NRRL 50088 y *T. atroviride* NRRL 50089, preparadas 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, las cepas pueden ser inoculadas 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:

Las cepas transformantes de *Trichoderma*, *T. virens* NRRL 50088 y *T. atroviride* NRRL 50089 de la presente invención pueden ser formuladas o

mezcladas 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 utilizadas 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.

10 La cantidad de producto formulado 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} .

15 Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones líquidas de las cepas transformantes de *Trichoderma*: *T. virens* NRRL 50088 y *T. atroviride* NRRL 50089 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
20 plantar como cuando las plantas están creciendo en los mismos.

Los polvos secos que contienen las cepas transformantes de *Trichoderma*, *T. virens* NRRL 50088 y *T. atroviride* NRRL 50089 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.

5 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 aplicaciones son ampliamente utilizados en la industria agrícola. Las cantidades típicas para
10 aplicación son entre 1 y 170 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 en suelos
15 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 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
20 que los mismos constituyan arte previo para la presente invención: Harman, G. E., "The Dogmas and 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
Foliar Phases of Turf Diseases By Use of Spray Applications," Plant Dis. 81:
1132-1138 (1997).

5

En otra modalidad de la presente invención, las cepas transformantes
de *Trichoderma*, *T. virens* NRRL 50088 y *T. atroviride* NRRL 50089 son
aplicadas directamente a las semillas, utilizando cualquier método de
tratamiento de semillas conocido en el arte. Por ejemplo, las semillas son
10 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 Treatments," Ann. Rev. Phytopathol 28: 321-339 (1990), los
15 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 las cepas de *Trichoderma*, *T. virens* NRRL 50088 y *T.*
20 *atroviride* NRRL 50089, ya sea solas o como parte de la composición antes
descrita, se pueden preinocular las semillas de jitomate o chile con una
cantidad agrónomicamente efectiva de las cepas de *Trichoderma*, *T. virens*

NRRL 50088 y *T. atroviride* NRRL 50089 para posteriormente sembrar las semillas de las plantas de manera tradicional.

Otra modalidad de la invención incluye aplicar las cepas de *Trichoderma*, *T. virens* NRRL 50088 y *T. atroviride* NRRL 50089 ya sea solas
5 o como parte de la formulación antes descrita directamente en la raíz de plantas de jitomate o chile. Las cepas transformantes pueden aplicarse como gránulos, polvo o solución líquida sobre el suelo del cultivo.

Uso de las cepas para promoción de crecimiento y resistencia a 10 fitopatógenos

Las cepas de *Trichoderma* de la presente invención, *T. virens* NRRL 50088 y *T. atroviride* NRRL 50089, son óptimas para utilizarse tanto solas, como en combinación con vehículos agronómicamente aceptables, para
15 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 obtenidas durante la fase de investigación realizada para la concreción del invento, como en comparación con las cepas silvestres de referencia.

20 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

Pruebas realizadas y caracterización de las cepas

5

Inoculación de semillas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) y de chile (*Capsicum annum*) con cepas transformantes de *Trichoderma* e infestación con bacterias y hongos fitopatógenos:

10 Inoculación de las semillas y manejo de las plántulas antes del transplante:

Las semillas de jitomate y chile utilizadas en este experimento fueron EL CID F1 (Harris Moran Seed Company). Estas se lavaron con hipoclorito de sodio al 5% por 5 minutos y después se enjuagaron con agua destilada por 5 minutos, esto con la finalidad de desinfectar la semilla y eliminar fungicidas que puedan traer como protección de fábrica. Las semillas húmedas fueron colocadas en una caja de Petri con una sanita y se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas, una vez transcurrido este tiempo las semillas se inocularon con las cepas transformantes de *Trichoderma virens* SE2.1, NRRL 15 50088 y SE6.2 y la cepa silvestre (WT), cepas transformantes de *T. atroviride* SE1.1, NRRL 20 50089, SE3.1 y *T. atroviride* silvestre. También se utilizaron

semillas de jitomate sin ninguna de las dos especies de hongos para utilizarlas como controles.

Las semillas de jitomate y chile se colocaron en una solución de 1×10^6 esporas/ml para posteriormente colocarlas en un charola de 264 cavidades, con peat-moss como sustrato estéril para evitar cualquier patógeno y permitir la germinación y crecimiento de las plántulas.

Después de 24 horas de sembradas las semillas se irrigaron con medio Murashige y Skoog (MS) al 30 % para permitir el rápido crecimiento de las cepas de *Trichoderma* y facilitar la colonización a las raíces. Seis días después de que las plántulas emergieron, fueron irrigadas con una solución nutritiva utilizando el producto HUMIFERT (Cosmocel) a una dosis de 3 cc/litro de agua, estas se dejaron en las charolas hasta los 22 días de haber sido sembradas.

Infestación de las plántulas de jitomate con *Alternaria solani* (A.s):

A 15 plántulas de jitomate y chile de 22 días de edad inoculadas previamente con cada una de las cepas de *Trichoderma*, se les lavaron las raíces y se transplantaron a las macetas que contenían únicamente sustrato, 24 h después de haber sido transplantadas se seleccionaron varias hojas al azar de cada plántula y se inocularon con 10 l de una solución de 1×10^5

esporas/ml del hongo fitopatógeno *Alternaria solani*. Las plantas estuvieron en observación hasta las 72 horas postinóculo para evaluar el daño en las hojas, además se incluyeron como control plantas sin tratamiento.

5 Ensayo de promoción de crecimiento en plantas de jitomate y chile:

Plántulas de 22 días de edad que se produjeron como anteriormente se describió, se sacaron de las charolas y se lavaron las raíces para evaluar parámetros de crecimiento de la plántula completa. Las plántulas después de
10 lavadas se midieron con una regla geométrica.

Resultados:

Promoción del crecimiento en plántulas de Jitomate (*Lycopersicon
15 esculentum*) (Ls) y de chile (*Capsicum annum*), por cepas transformantes del hongo micoparásito *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma virens*.

En la Figura 1, se puede observar que las plantas de jitomate que fueron inoculadas con las cepas transformantes de *T. atroviride* (SE1.1; NRRL
20 50089; SE3.1), crecieron entre 7 y 8 cm más que las plantas sin inocular y 5 cm más que las cepas inoculadas con la cepa silvestre de *Trichoderma atroviride*, también puede observarse que esta última al inocularse a plantas

de jitomate, crecieron aproximadamente 2.5 cm más que las que no fueron inoculadas.

Para el caso de la Figura 2, las plantas de jitomate, inoculadas con las
5 cepas transformantes de *Trichoderma virens* (SE2.1, NRRL 50088, SE6.2),
mostraron un patrón de crecimiento semejante a las inoculadas con las cepas
transformantes de *T. atroviride*. Las plantas inoculadas con la cepa silvestre
de *Trichoderma virens*, crecieron entre 2 y 3 cm más que las plantas sin
inocular, pero entre 4 y 5 cm menos que las inoculadas con las cepas
10 transformantes.

Para el caso del efecto de las cepas transformantes de *T. atroviride* en
el crecimiento sobre plántulas de chile, se puede observar que las plántulas
inoculadas con las cepas TaSE1.1 y TaSE3.1, presentaron un mayor
15 crecimiento (aproximadamente 10 cm) que las que fueron inoculadas con la
cepa silvestre de *Trichoderma atroviride* y esta última, no mostró diferencias
significativas con el control sin inocular. Por otro lado, aunque en menor
grado, la cepa NRRL 50089 también mostró un mejor efecto sobre el
crecimiento de las plantas comparada con la cepa silvestre de entre 4 y 6 cm
20 (Figura 3). Las plántulas de chile inoculadas con las cepas de *Trichoderma*
virens SE2.1, NRRL 50088 y TvSE6.2 (Figura 4) muestran una tendencia
semejante a las mostradas por las cepas transformantes de *T. atroviride*
(Figura 3). Una diferencia muy importante en este caso, es que la cepa

silvestre de *Trichoderma virens* si presentó un efecto significativo sobre plántulas de chile comparado con las plántulas que no fueron inoculadas (Figura 4).

5 Ensayos de protección por cepas transformantes del hongo micoparásito *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma virens* contra el hongo fitopatógeno *Alternaria solani* (As) sobre plántulas de Jitomate (*Lycopersicon esculentum*) (Ls) y de chile (*Capsicum annum*).

10 En estos experimentos, las plántulas de jitomate y chile fueron inoculadas con las diferentes cepas de *T. atroviride* y *T. virens*, para posteriormente inocularlas con el hongo fitopatógeno As. En la Figura 5, se puede observar que las plántulas que fueron tratadas con la cepa silvestre de *Trichoderma atroviride*, presentaron aproximadamente un 25% de daño en las
15 hojas, mientras que, las que no fueron inoculadas con las cepas transformantes de *T. atroviride* presentaron un 50% de daño, cuando las plántulas de jitomate fueron tratadas con las tres cepas transformantes de *T. atroviride* (SE1.1; NRRL 50089; SE3.1), prácticamente se abatió el daño provocado por el hongo fitopatógeno, el nivel de daño fue semejante al de las
20 plántulas que no fueron inoculadas con el fitopatógeno As, es decir, 0.0%. Como se muestra en la Figura 6, las plántulas inoculadas solamente con el patógeno As presentaron entre un 37-47% de daño, mientras que, para el caso de las plántulas que fueron inoculadas con la cepa de *Trichoderma*

virens SE2.1, se obtuvo prácticamente 0% de daño en las hojas, al igual que las plántulas sin inocular con el fitopatógeno As, resultando ser la cepa que mejor protegió a las plántulas. Aunque en menor grado de protección, pero con un resultado mejor que el proporcionado por la cepa silvestre de *Trichoderma virens*, la cepa NRRL 50088, disminuyó hasta un 10% el daño provocado por As. Para el caso de la cepa silvestre de *Trichoderma virens* también protegió a las plántulas de jitomate las cuales presentaron un 17-25% de daño, pero en menor proporción que las cepas transformantes, en el caso de la cepa NRRL 50088 el daño es de prácticamente 0.0% mostrado también en la Figura 6.

En los ensayos de protección sobre plántulas de chile (*Capsicum annum*) de las cepas transformantes de *T. atroviride* contra As, las cepas protegen en un menor porcentaje sin que este deje de ser significativo. Cuando las plántulas de chile fueron expuestas solamente a As, el porcentaje de daño en las hojas de chile fue por arriba del 40% como se ve en la Figura 7, mientras el daño en las hojas de chile inoculadas con la cepa silvestre de *Trichoderma atroviride*, disminuyó hasta un 20-27%, mostrado asimismo en la Figura 7.

20

La cepa que disminuyó el daño en las hojas de chile de manera significativa, fue la *Trichoderma atroviride* SE1.1, llegando a valores cercanos al 10%, mientras que los valores de daño en las hojas para las plántulas

inoculadas con las cepas NRRL 50089 y SE3.1 oscilaron alrededor del 15%, a pesar de ello, protegieron a las plantas mejor que la cepa silvestre de *Trichoderma atroviride* como puede verse en la Figura 7.

5 Las cepas de *T. virens* que disminuyeron el daño por As en aproximadamente 40% en las hojas de chile, fueron la *Trichoderma virens* SE2.1 y la NRRL 50088 con valores de 5% de daño, mientras que la cepa SE6.2 solamente logró bajar los niveles de daño a aproximadamente un 12-15%, con valores muy similares a los obtenidos con la cepa silvestre de
10 *Trichoderma virens* que fue de 18% aproximadamente como se aprecia en la Figura 8.

Plantas inoculadas con cepas transformantes que sobreexpresan el gen SM1 de *T. virens* y *atroviride* presentan resistencia contra *Pseudomonas syringae*

15 pv. *tomato*

Infestación de las plántulas de jitomate con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Plántulas de tomate de 25 días de edad, previamente inoculadas con la
20 cepa silvestre y con cada una de las cepas transformantes de *T. virens* y *T. atroviride*, fueron transplantadas a macetas con sustrato peat moss. Después de 24 hrs de haber sido transferidas las plántulas de tomate, se seleccionaron diez hojas de cada una planta y se hirieron con una aguja para facilitar la

entrada del patógeno al momento de ser inoculadas. Las hojas heridas fueron inoculadas con 20 μ l de una solución de bacterias crecidas en medio Kings B a una OD = 0.2, suplementada con 0.1 % de agente penetrante (Break-Thru, Goldsmidt Chemical corporation). Para el caso de las plantas control, fueron
5 inoculadas con agua mas agente penetrante. Las plantas de tomate con los diversos tratamientos estuvieron en observación hasta la aparición de los síntomas, los cuales fueron evaluados 240 horas después de la inoculación. El daño foliar provocado por la bacteria fue medido con una regla geométrica y cuantificado en función del al área dañada por el área total y se expresó de
10 manera porcentual.

Resultados:

Con la finalidad de evaluar la capacidad protectora de las cepas de *Trichoderma* durante la interacción planta-*T. virens*- *P. tomato* pv *syringe*,
15 semillas de tomate fueron inoculadas con las cepas transformantes SE2.1, NRRL 50088 y SE6.2 y con su respectiva cepa silvestre de *T. virens*. Después de 25 días del transplante, las plántulas fueron confrontadas con la bacteria patógena foliar *P. tomato* pv *syrigae* inoculando una solución de bacterias a una DO= 0.2. Los daños provocados por la bacteria fueron evaluados a las
20 240 horas postinóculo. En la Figura 9 podemos observar que las hojas de las plantas inoculadas con las cepas de *T. virens* presentaron menor severidad en los daños provocados por este patógeno al compararlo con las hojas de la planta que no fueron inoculadas con *Trichoderma*. Para el caso de las

plántulas inoculadas con la cepa silvestre se observa que hay un mínimo en la disminución del daño, baja de 10% a apenas un 9% de daño, mientras que, las plantas inoculadas con las cepas transformantes SE2.1, NRRL 50088 y SE6.2 presentaron menor daño comparado con la cepa silvestre de *T. virens*,
5 resultando con una mayor eficiencia de protección la cepa SE2.1, disminuyendo el daño foliar hasta un 4%.

En la figura 10 se observa el efecto protector contra la bacteria fitopatógena *Pseudomonas tomato* pv *syringae* que proporcionan las diferentes cepas de *Trichoderma atroviride* al ser inoculadas en plantas de
10 tomate. Las plántulas que no fueron inoculadas con las cepas de *Trichoderma*, pero si con la bacteria fitopatógena, presentaron un 11% de daño foliar, mientras que las plántulas inoculadas con la cepa silvestre de *Trichoderma atroviride* presentaron un ligero decremento en la severidad de los daño llegando a disminuir el daño en un 1%. Las hojas de las plantas
15 inoculadas con las cepas de *Trichoderma atroviride* SE 1.1, NRRL 50089, y SE3.1 disminuyeron el daño generado por la bacteria en un poco más de la mitad (entre el 4 y el 5%) que el observado con las plantas inoculadas con la cepa silvestre.

Puesto que se pueden hacer varios cambios a los métodos
20 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 acompañantes deben interpretarse como ilustrativos y no en un sentido limitante.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

1.- Una cepa transformante de *Trichoderma atroviride*, con número de
5 acceso NRRL 50089.

2.- La cepa transformante de conformidad con la reivindicación 1,
caracterizada además porque sobreexpresa el gen SM1.

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

4.- La cepa transformante de conformidad con cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 3, caracterizada además porque la planta es jitomate o
chile.

5.- Un método para promover el crecimiento y la resistencia a
15 fitopatógenos en plantas, caracterizado porque comprende aplicar una cepa
transformante de *Trichoderma atroviride* como la que se reclama en la
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 6.- 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.

7.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, caracterizado además porque la planta es jitomate o chile.

8.- El uso de una cepa transformante 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.

9.- El uso de conformidad con la reivindicación 8, en donde las plantas solanáceas son jitomate o chile.

10.- Un método para obtener una cepa de *Trichoderma atroviride* como la que se reclama en la reivindicación 1, caracterizado porque comprende los pasos de: a) amplificar por PCR el gen *SM1* de hongos del genero *Trichoderma* y clonarlos en vectores de expresión para su sobreexpresión en cepas receptoras que sean del genero *Trichoderma* y b) generar las cepas sobreexpresantes del gen *SM1*.

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

20 12.- La formulación agronómica de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada además porque promueve el crecimiento y la resistencia a bacterias y hongos fitopatógenos en plantas solanáceas.

13.- La formulación agronómica de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada además porque las plantas solanáceas son jitomate o chile.

14.- La formulación agronómica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizada además porque está en forma de polvo, suspensión líquida o gránulos.

15.- Una cepa transformante de *Trichoderma virens*, con número de acceso NRRL 50088.

16.- La cepa transformante de conformidad con la reivindicación 15, caracterizada además porque sobreexpresa el gen SM1.

17.- La cepa transformante de conformidad con la reivindicación 15, caracterizada además porque promueve el crecimiento y la resistencia a fitopatógenos en plantas solanáceas.

18.- La cepa transformante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizada además porque la planta es jitomate o chile.

19.- Un método para promover el crecimiento y la resistencia a fitopatógenos en plantas, caracterizado porque comprende aplicar una cepa transformante de *Trichoderma atroviride* como la que se reclama en la reivindicación 15, 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.- El método de conformidad con la reivindicación 19, 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.

21.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20, caracterizado además porque la planta es jitomate o chile.

22.- El uso de una cepa transformante como la que se reclama en la reivindicación 15, para preparar una formulación agronómica, para promover el crecimiento y la resistencia a fitopatógenos, tales como hongos y/o bacterias en plantas solanáceas.

23.- El uso de conformidad con la reivindicación 22, en donde las plantas solanáceas son jitomate o chile.

24.- Un método para obtener una cepa de *Trichoderma virens* como la que se reclama en la reivindicación 15, caracterizado porque comprende los pasos de: a) amplificar por PCR el gen *SM1* de hongos del género *Trichoderma* y clonarlo en vectores de expresión para su sobreexpresión en cepas receptoras que sean del género *Trichoderma* y b) generar las cepas sobreexpresantes del gen *SM1*.

25.- Una formulación agronómica, caracterizada porque comprende una cepa transformante de *Trichoderma atroviride* como la que se reclama en la reivindicación 15 y un vehículo agronómicamente aceptable.

26.- La formulación agronómica de conformidad con la reivindicación 25, caracterizada además porque promueve el crecimiento y la resistencia a bacterias y hongos fitopatógenos en plantas solanáceas.

27.- La formulación agronómica de conformidad con la reivindicación 26, caracterizada además porque las plantas solanáceas son jitomate o chile.

28.- La formulación agronómica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, caracterizada además porque está en forma de polvo, suspensión líquida o gránulos.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención describe y reclama cepas transformantes novedosas del hongo *Trichoderma ssp.*, capaces de promover el crecimiento y

5 la resistencia a fitopatógenos en plantas de interés agronómico de una manera significativa en comparación con las cepas convencionales. La utilización de estas cepas disminuyen considerablemente el uso abonos y de pesticidas químicos cuya fabricación y uso dañan el medio ambiente y la salud humana.

Figura 1

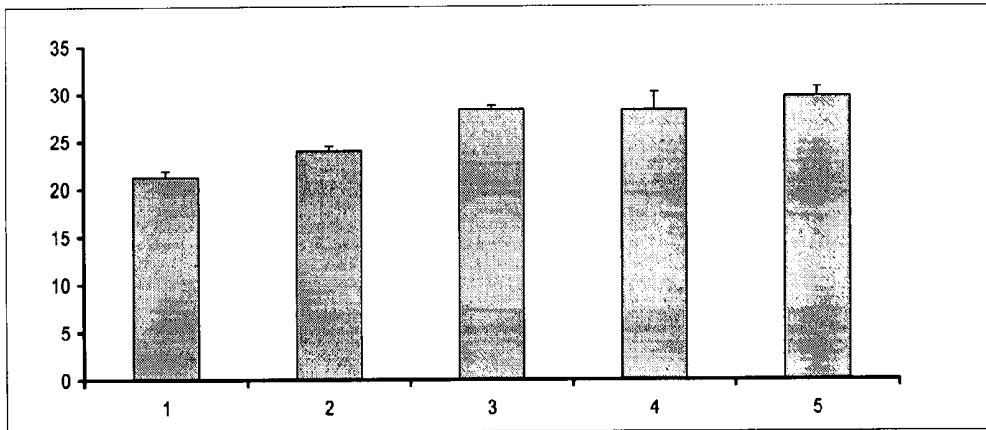


Figura 2

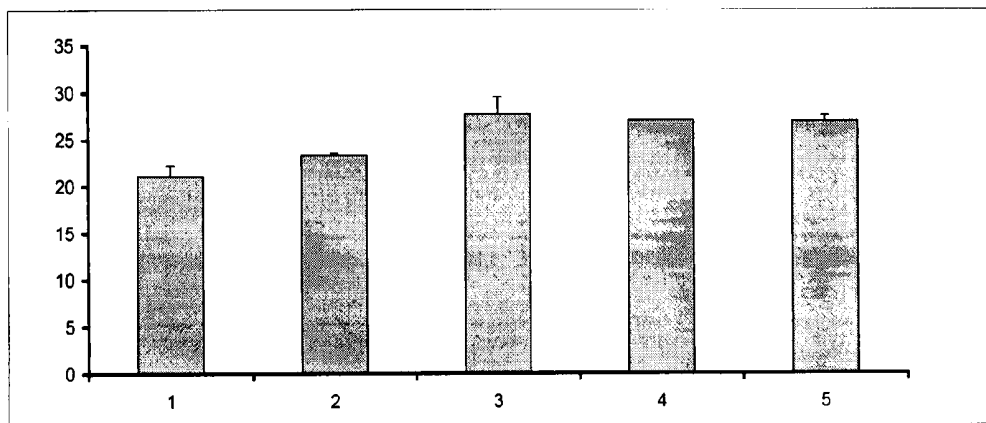


Figura 3.

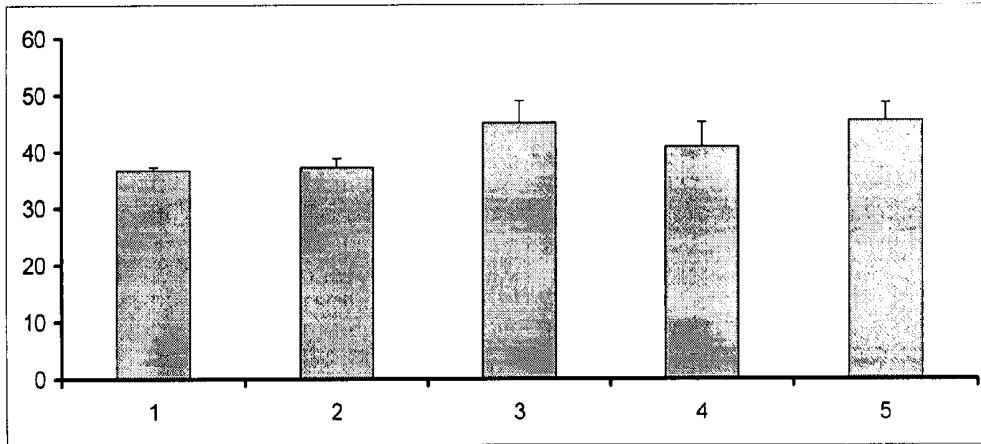


Figura 4.

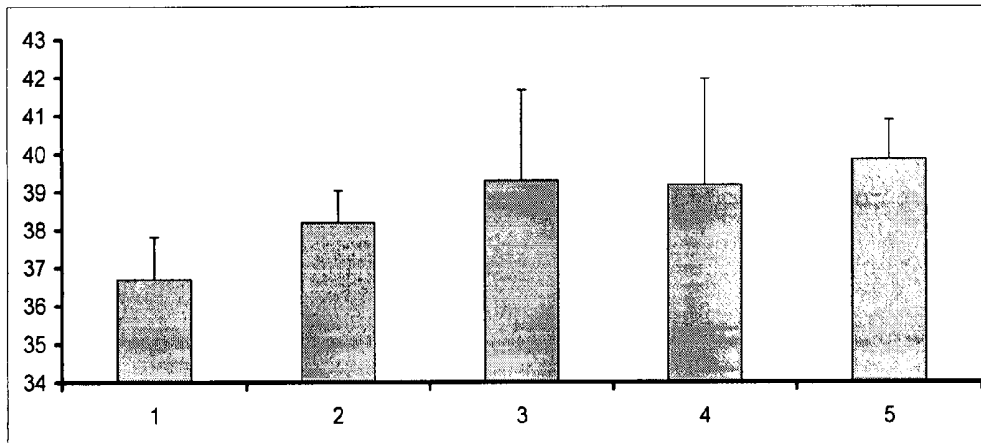


Figura 5.

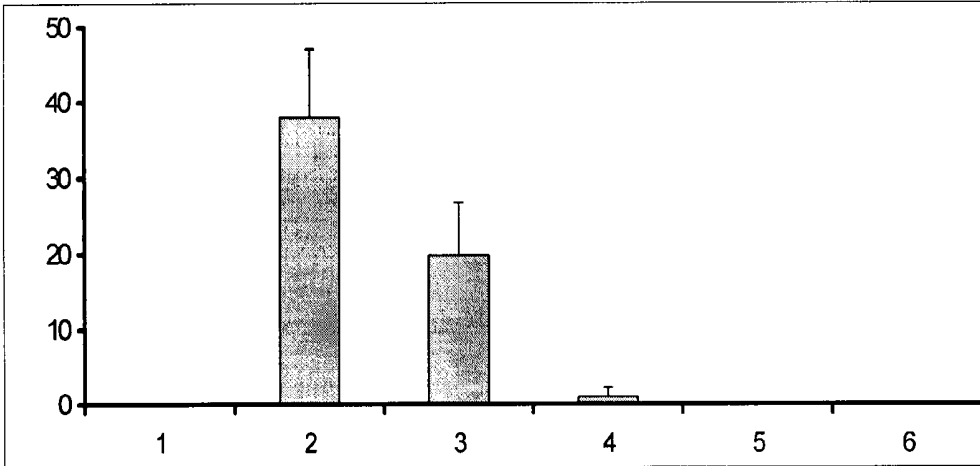


Figura 6.

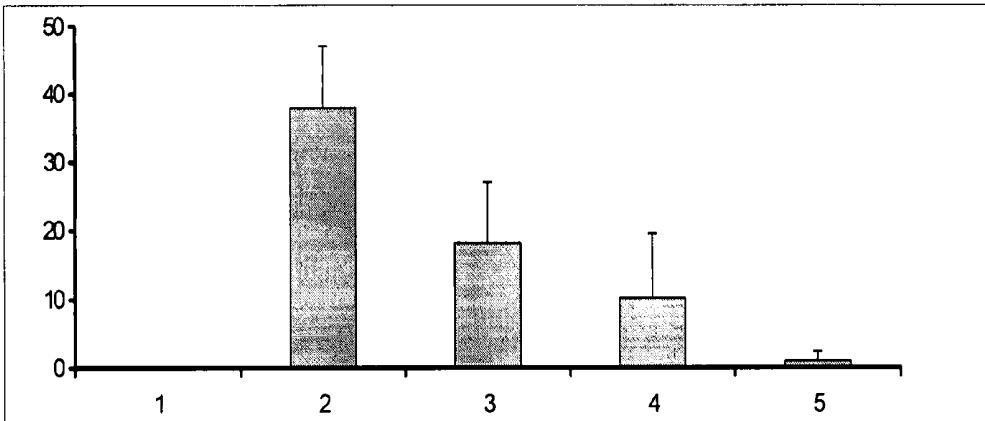


Figura 7.

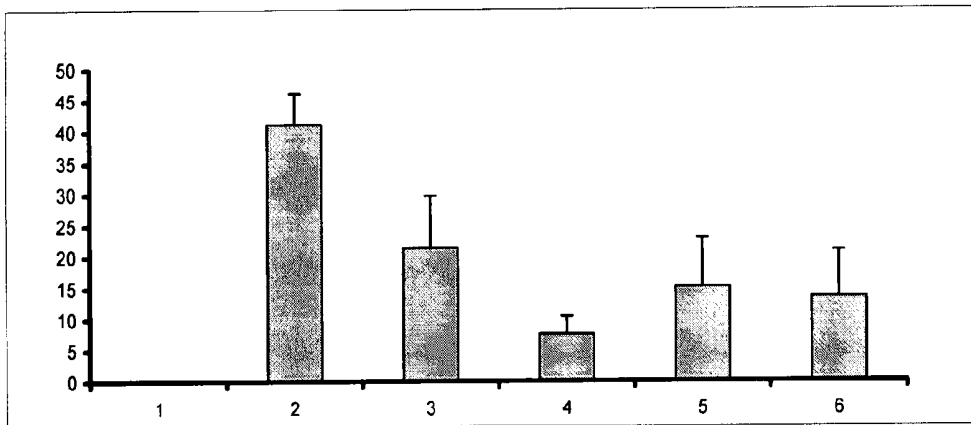


Figura 8.

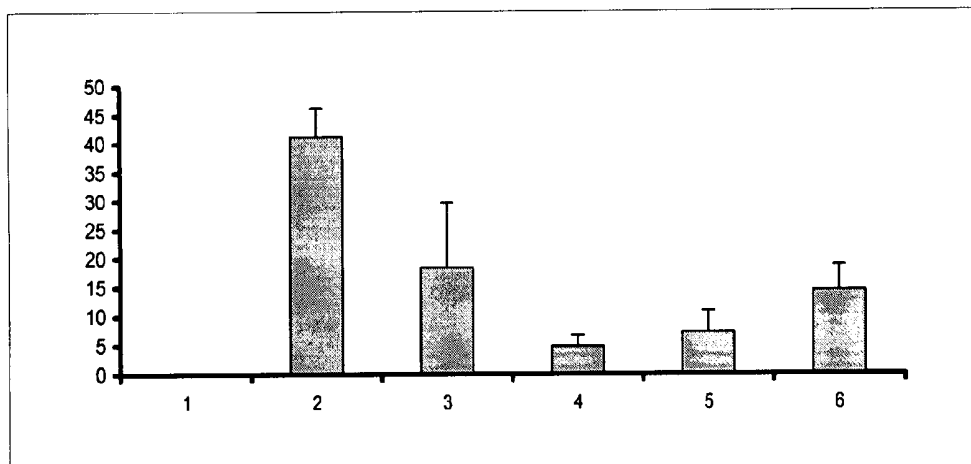


Figura 9.

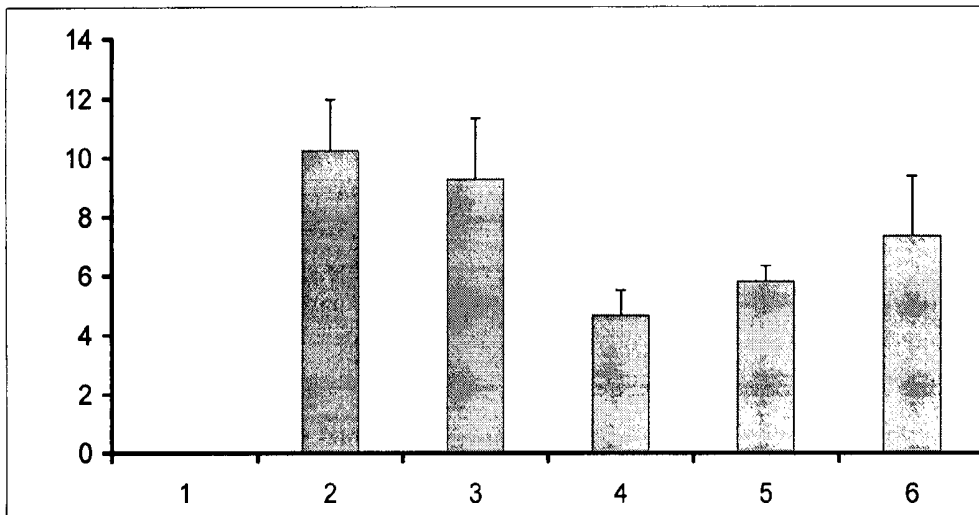


Figura 10.

