

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
3 de Julio de 2008 (03.07.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2008/077982 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
A01N 63/00 (2006.01) A01N 25/08 (2006.01)  
A01N 63/04 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2007/070198

(22) Fecha de presentación internacional:  
4 de Diciembre de 2007 (04.12.2007)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P200603290  
27 de Diciembre de 2006 (27.12.2006) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo  
US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGA-  
CIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano 117,  
E-28006 Madrid (ES). **PASCUAL VALERO, Jose, An-  
tonio** [ES/ES]; Centro De Edafología Y Biología Aplicada  
Del Segura, Campus Universitario de Espinardo, E-30100  
Murcia (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):  
**NAVARRO VILLAMOR, Noelia** [ES/ES]; Centro  
De Edafología Y Biología Aplicada Del Segura, Cam-  
pus Universitario de Espinardo, E-30100 Murcia (ES).  
**HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Maria, Teresa** [ES/ES];  
Centro De Edafología Y Biología Aplicada Del Segura,  
Campus Universitario de Espinardo, E-30100 Murcia (ES).  
**GARCÍA IZQUIERDO, Carlos, Javier** [ES/ES]; Entro  
De Edafología Y Biología Aplicada Del Segura, Cam-  
pus Universitario de Espinardo, E-30100 Murcia (ES).

**BERNAL VICENTE, Agustina** [ES/ES]; Centro De  
Edafología Y Biología Aplicada Del Segura, Campus Uni-  
versitario de Espinardo, E-30100 Murcia (ES). **LÓPEZ  
MONDÉJAR, Rubén** [ES/ES]; Centro De Edafología Y  
Biología Aplicada Del Segura, Campus Universitario de  
Espinardo, E-30100 Murcia (ES). **MARTÍNEZ MED-  
INA, Ainhoa** [ES/ES]; Centro De Edafología Y Biología  
Aplicada Del Segura, Campus Universitario de Espinardo,  
E-30100 Murcia (ES). **ANTÓN GARCÍA, Ana, Isabel**  
[ES/ES]; Centro De Edafología Y Biología Aplicada Del  
Segura, Campus Universitario de Espinardo, E-30100  
Murcia (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,  
para toda clase de protección nacional admisible): AE,  
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW,  
BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,  
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,  
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,  
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,  
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO  
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,  
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,  
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,  
MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,  
TG).

Publicada:  
— con informe de búsqueda internacional

(54) Title: SOLID PRODUCT EFFECTIVE FOR BIOCONTROL OF VASCULAR FUSARIOSIS OF MELON, METHOD FOR PREPARATION THEREOF AND METHOD FOR USE OF SAME

(54) Título: PRODUCTO SÓLIDO EFICAZ PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL MELÓN, SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y MÉTODO DE APLICACIÓN DEL MISMO

(57) Abstract: Solid product effective for biocontrol of vascular fusariosis of melon, method for preparation thereof and method for use of same. The invention is part of the technical field of conventional and organic agriculture, is applicable both in fields and nurseries and provides a solid product effective for the biological control of vascular fusariosis of melon based on the use of a strain of *T. harzianum*, a fungus antagonistic to the pathogen (*F. oxysporum sp. melonis*), on an inert solid carrier and incorporates additional factors which improve the biocontrol capacity of the product. The invention also relates to the method for preparing the product and the method of use thereof.

(57) Resumen: Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular del melón, su procedimiento de obtención y método de aplicación del mismo. La invención se encuadra dentro del campo técnico de la agricultura convencional y ecológica, y es aplicable tanto en semillero como en campo. Proporciona un producto sólido eficaz para el control biológico de fusariosis vascular de melón basado en el uso de una cepa de *T. harzianum*, hongo antagonista del patógeno (*F. oxysporum sp. melonis*), sobre una matriz sólida inerte e incorpora factores adicionales que mejoran la capacidad biocontrol del producto. La invención también se refiere al procedimiento de obtención del producto y a su método de aplicación.

WO 2008/077982 A1

## TÍTULO

PRODUCTO SÓLIDO EFICAZ PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL MELÓN, SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y MÉTODO DE APLICACIÓN DEL MISMO.

5

## SECTOR DE LA TÉCNICA:

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la agricultura convencional y ecológica, y es aplicable tanto en semillero como en campo. En concreto se refiere a un producto sólido eficaz para el control biológico de fusariosis vascular en melón, su procedimiento de obtención y método de aplicación del mismo.

10

## ESTADO DE LA TÉCNICA:

La fusariosis vascular del melón es una enfermedad muy común, ocasionada por diferentes razas de *Fusarium oxysporum* que produce importantes pérdidas en cultivos, principalmente en zonas con temperaturas elevadas. La fusariosis es un problema grave en el campo de cultivo pero sobre todo resulta importante en los semilleros, ya que las condiciones de cultivo en éstos favorecen el desarrollo y dispersión del patógeno debido a la producción de un gran número de plantas en un espacio reducido y cerrado.

15

20

Los métodos habituales para control de fitopatógenos incluyen el uso de grandes cantidades de sustancias químicas como los fungicidas, sustancias que en algunos casos están clasificadas como cancerígenas y/o tóxicas y que en muchos países están prohibidas. Estas sustancias químicas además, en multitud de ocasiones resultan ineficaces.

25

Contra la fusariosis de melón no hay un control químico efectivo, únicamente es posible la desinfección del suelo utilizando productos altamente nocivos tanto para el medioambiente como para la salud humana. Por este motivo son muchos los esfuerzos encaminados a investigar métodos alternativos.

30

El control biológico de la fusariosis mediante el empleo de microorganismos antagonistas es una de las alternativas más prometedoras. Entre los agentes de control biológico más importantes se encuentran los

hongos pertenecientes al género *Trichoderma* que son capaces de controlar un amplio abanico de microorganismos patógenos de plantas de interés agrícola. Cinco especies de *Trichoderma* (*T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. polysporum* y *T. viride*) son las más importantes para biocontrol (Hoitink y Boehm, 1999). Sin embargo, aunque han tenido un éxito relativo, todavía no ha sido posible alcanzar un nivel suficiente en el control de fitopatógenos.

En la actualidad existen diferentes métodos de control biológico de fitopatógenos basados en la utilización de diversas especies y cepas del hongo *Trichoderma*. La mayor parte de los métodos relacionados con el control de enfermedades mediante el uso de *Trichoderma* están basadas en el uso de diferentes especies de este género tales como *T. asperellum*, *T. artroviride*, *T. inhamatum* para el control biológico de fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* (ES 2200602; 2000, y ES 2219523; 2004), *T. harzianum* por si solo para el control de *Botritis. cinerea* y de *Sclerotinia sclerotiorum* (IL2103758; 1997), o en combinación con *T. viride* para el control de *Rhizoctonia solani* (ES 2109182; 1995). También se ha descrito el uso de *T. viridae* por si sólo (US 6,808,917; 2002) o bien *T. hamatum*, con otros microorganismos complementarios como *Flavobacterium balustinum*, para el control de *R. solani* y *Pythium ultimum* (US 4.900.348; 1987). Además, existen productos comerciales basados en el uso de *Trichoderma* tanto en formulación líquida (Stimulase (Ecocert Francia nº 08-884, SCPA Agronutrición), Trichomic (AMC Chemical y Trichodex) y Trianum-G (Koppert) como sólida en forma de polvo (Tricho-tec Ecocert-SHC nº VA-22P-2, Técnicas de control biológico), Trianum-P (Koppert), Trichotem (BCS Öko-Garantie QUIM\_MERI\_8244/02.04/4215-ES, Químicas Meristem), *T. harzianum* DIB- 32 (Productos Flower). No obstante ninguno de estos productos está descrito de forma específica para el control de la fusariosis vascular de melón y en los casos en que se hace mención al control de *F. oxysporum* es en una gama de microorganismos fitopatógenos.

La tendencia generalizada del mercado es la oferta de productos de amplio espectro, pero hay que tener en cuenta que cada tipo de patógeno tiene un mecanismo de infección distinto, por lo que son necesarios mecanismos de control diferenciados.

Se ha propuesto un método específico para el control de la fusariosis vascular de melón que está basado en la utilización de compost supresivos previamente inoculados con *T. harzianum* cepa T-34 (ES 188385 A1). Sin embargo, el uso de compost supresivos tiene la desventaja de que sólo se pueden aplicar a los suelos y no a los sustratos de semilleros ya que pueden inhibir la germinación y desarrollo de las plántulas. La patente US0285987; 1985 describe un método de control de fitopatógenos de cuello tales como *Pythium* sp y *Rhizoctonia* sp mediante la utilización de protoplastos obtenidos de diferentes géneros de *Trichoderma*, que se embeben en las semillas por si solos o en matrices orgánicas que, una vez germinadas, adquieren resistencia. Su desventaja principal es el bajo contenido final de *Trichoderma* en el sustrato de germinación que es crítico en el control de la fusariosis de melón.

La mayor parte de las tecnologías disponibles hasta el momento para el control biológico de fitopatógenos se presentan bajo una formulación líquida, lo que facilita su aplicación pero condiciona su eficacia dada la baja capacidad de supervivencia que muestran los microorganismos al pasar de un medio líquido (forma suministrada) a uno sólido (lugar donde debe realizar su acción, bien sea suelo o sustrato orgánico). Otra limitación importante de dichas tecnologías es el tiempo de adaptación al nuevo medio y la necesidad de encontrar un nicho ecológico del microorganismo inoculado, que limita enormemente su potencial supervivencia en el suelo o sustrato orgánico, cuestión que no ha sido resuelta por ninguna de las tecnologías disponibles hasta el momento.

Por todo ello, y dada la problemática específica de la fusariosis del melón, es necesario desarrollar productos y procedimientos específicos para el control biológico de la fusariosis vascular de melón basados en el uso de microorganismos antagonistas con alta capacidad como agentes biocontrol (Inbar *et al.*, 1994), que sean aplicables tanto en semillero como en campo, capaces de sobrevivir en el sustrato y que la inoculación se realice sobre soporte sólido. Este ha sido el objeto de la presente invención y su novedad radica en que proporciona un producto específico para el control de la fusariosis vascular en melón, con elevada especificidad y alta capacidad como agente biocontrol, hasta ahora inexistente. Además, el producto objeto de la

presente invención, es sólido, el agente muestra altos niveles de supervivencia en el sustrato y es aplicable tanto en semillero como en campo. Una ventaja adicional de la presente invención, que se basa en el uso de un producto natural, es que aumenta el conjunto de remedios biológicos para luchar contra los agentes causantes de enfermedades de plantas, encaminado siempre a disminuir, en la medida de lo posible, el uso indiscriminado de sustancias químicas.

#### EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

10 La presente invención proporciona un producto sólido eficaz para el control biológico de fusariosis vascular de melón, su procedimiento de obtención y método de aplicación del mismo.

En un aspecto particular la invención se refiere a un producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón caracterizado porque comprende (i) un microorganismo antagonista de *F. oxysporum* con capacidad biocontrol sobre éste. (ii) Un soporte sólido para la inoculación del microorganismo antagonista (iii) y factores adicionales que mejorar la capacidad biocontrol del producto.

En otro aspecto particular la invención se relaciona con un producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón basado en el uso de *T. harzianum* como microorganismo antagonista.

En otro aspecto particular la invención se relaciona con un producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón que utiliza como soporte sólido bentonita.

25 En otro aspecto particular la invención se relaciona con un producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón que incorpora como factores adicionales  $\text{CO}_3\text{Ca}$  y quitosano como corrector de pH e inductor de la síntesis de quitinasas, respectivamente.

En otro aspecto particular la invención se relaciona con un procedimiento de obtención de un producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón caracterizado porque sus componentes se incuban a temperaturas entre 20-30°C por un tiempo entre 1 y 10 días.

En otro aspecto particular la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de un producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón caracterizado porque sus componentes se mezclan, trituran e incuban durante 5 días a 25-28 °C.

5 En otro aspecto particular la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de un producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón caracterizado porque comprende la preparación de un soporte sólido como bentonita, que incorpora como factores adicionales  $\text{CO}_3\text{Ca}$  y quitosano como corrector de pH e inductor de la síntesis de  
10 quitinasas, respectivamente, todo ello mezclado y homogeneizado en seco. A dicha mezcla se inocula un cultivo biológicamente puro de la cepa de *T. harzianum* T78 N° CECT 20714, y se mezcla e incuba durante 5 días a 28-25 °C. El producto resultante se mezcla con turba al 10 % mediante el uso de una mezcladora estándar de las utilizadas en los semilleros comerciales.

15 Otro aspecto particular de la invención lo constituye un procedimiento para inducir resistencia sistémica a enfermedades causadas por organismos fitopatógenos que comprende aplicar una cantidad eficaz del producto objeto de la invención sobre el suelo o la planta a la que se desea inducir resistencia sistémica a enfermedades.

20 En otro aspecto particular la invención se relaciona con un procedimiento para estimular el crecimiento de plantas que comprende aplicar una cantidad eficaz del producto objeto de la invención sobre suelo o planta cuyo crecimiento se desea estimular.

Otro aspecto particular de la invención es la utilización del producto  
25 objeto de la invención para el control biológico de esta enfermedad en semillero.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye la utilización del producto objeto de la invención para el control biológico de la fusariosis vascular en campo de cultivo.

30 En otro aspecto particular la invención se relaciona con el uso de *Trichoderma harzianum*, cepa T-78, CECT N° 20714 para el control biológico de la fusariosis vascular.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1: Gráfico de barras dónde se refleja el crecimiento en placas Petri sobre ensayo en placa dual de *F. oxysporum* enfrentadas a diferentes cepas de *Trichoderma*. En el eje de abscisas se representan las cepas de *Trichoderma sp.* que mostraron un mejor resultado para los intereses y/o objetivos a desarrollar ( C (Control de Fusarium), TC (cepa comercial) y cepas T82, T78, T010, T190 y T1) y en el eje de ordenadas el crecimiento final a los siete días sobre la placa Petri en centímetros.
- 10 Figura 2: Crecimiento sobre turba de las cepas de *Trichoderma sp.* atendiendo al criterio de supresividad frente a *F oxysporum* (A) y supervivencia en turba de la cepa T78 (B). En el eje de abscisas de la Figura 2 (A) se representan las diferentes cepas estudiadas, (T78; T82, T1, T010; T190 y TC (comercial)) y en la Figura 2 (B) se representa la cepa de *Trichoderma* T78 inoculada en turba y turba sin inocular. En el eje de ordenadas de la Figura 2 (A) se muestra el número de unidades formadoras de colonias (ufc) x 10<sup>6</sup> por gramo de turba analizado y en la Figura 2 (B) se muestra el porcentaje de CO<sub>2</sub> desprendido en el medio.
- 15
- 20 Figura 3: Evolución de *F. oxysporum* sometido a los diferentes tratamientos pasados 15, 37 y 48 días de su inoculación respectivamente. En el eje de abscisas se representan cada una de las formas en que se inoculó la solución de la cepa *T. harzianum* T78 en la turba. (C: control sin inocular, 1: solución de esporas, 2: embebiendo a la semilla con una solución de esporas en carboximetilcelulosa, 3: embebiendo a la semilla con una solución de esporas en goma arábica, 4: bentonita previamente inoculada con la suspensión de esporas, 5: vermiculita previamente inoculada con la suspensión de esporas, 6: incorporación de esporas con una fuente carbonada rica en lignocelulosa, 7: tratamiento similar al tratamiento 5 pero en este caso la vermiculita se incorporó en la parte superior de las bandeja de germinación y el eje de ordenadas muestra el número de ufc *F. oxysporum* x 10<sup>6</sup> por gramo de turba analizado.
- 25
- 30

Figura 4: Evolución de la cepa de *T. harzianum* T78 en turba, tras su aplicación en los diferentes soportes. En el eje de abscisas se representan los diferentes tratamientos del 1 al 7 y el control (C). En el eje de ordenadas se muestra el número de ufc de *T. harzianum* T78 x 10<sup>6</sup> por gramo de turba analizado a los 0, 2, 15, 37 y 48 días.

Figura 5: Porcentaje de infección por *F. oxysporum* (A) y Peso seco (g.) (B) de las plantas de melón tratados con los distintos soportes, después de 15, 33 y 48 días de cultivo en semillero. En el eje de abscisas se representan los diferentes tratamientos, del 1 al 7 y el control (C). En el eje de ordenadas de la Figura A se muestra el porcentaje de infección por *F. oxysporum* de un total de 20 plantas y en la Figura B los gramos de peso seco de las plantas de melón.

Figura 6: Efecto de la aplicación de bentonita complementada con carbonato cálcico y quitosano sobre el peso seco (g.) (A) y porcentaje de infección por *F. oxysporum* de las plantas de melón (B), después de 48 días de cultivo en semillero. En el eje de abscisas se representan los tratamientos T: Turba; Ti: Turba inoculada con la cepa T78 en Bentonita y TiQ: Turba inoculada con la cepa T78 en bentonita complementada con CO<sub>3</sub>Ca y quitosano. En el eje de ordenadas de la Figura 6(A) se muestra los gramos de peso seco de las plantas de melón y de la Figura 6(B) el porcentaje de infección por *F. oxysporum* de un total de 20 plantas.

Figura 7: Efecto de la aplicación sobre turba de bentonita complementada con carbonato cálcico y quitosano sobre la cepa de *T. harzianum* T78 (A) y *F. oxysporum* (B) y el porcentaje de infección por *F. oxysporum* de las plantas de melón (C) después de 48 días de cultivo de plantas de melón en semillero. En el eje de abscisas se representan los tratamientos, (T: Turba; Ti: Turba inoculada con la cepa T78 en Bentonita y TiQ: Turba inoculada con la cepa T78 en bentonita complementada con CO<sub>3</sub>Ca y quitosano), mientras que el eje de ordenadas muestra el número de ufc (escala logarítmica) por gramo de turba analizado de *T. harzianum* T78 (A), de *F. oxysporum* (B) y en (C) se representa el porcentaje de infección por *F. oxysporum*.



## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un producto sólido eficaz para el control biológico de fusariosis vascular de melón basado en el uso de una cepa de *T.harzianum*, hongo antagonista del patógeno (*F. oxysporum sp. melonis*), sobre una matriz sólida inerte. La invención también se refiere al procedimiento de obtención del producto y a su método de aplicación.

La invención se basa en el uso de una cepa natural de *T. harzianum* aislada de sustratos orgánicos de similares características a las turbas que se utilizan en semilleros, lo que aumenta su capacidad de supervivencia y disminuye la frecuencia de aplicación del producto.

Como soporte sólido se utiliza bentonita que tiene alta capacidad de retención de humedad, permite fijar tanto formas reproductoras como vegetativas activas (miceliares) del hongo, a una concentración adecuada para facilitar que el agente antagonista empiece a actuar desde el momento de la aplicación, y mantiene altas concentraciones de éste en el sustrato. Además, por su elevada capacidad de adherencia, la bentonita actúa como protector físico de la raíz evitando la entrada de patógenos, de este modo potencia el efecto biocontrol y permite inmovilizar enzimas producidas por *T. harzianum* capaces de degradar la pared celular de ciertos patógenos como *F. oxysporum*, incrementando la eficacia del producto objeto de la presente invención.

La invención utiliza carbonato cálcico para corregir el pH de la bentonita natural, hasta un pH próximo al óptimo para el crecimiento de la cepa de *T. harzianum* inmovilizada, lo que mejora su capacidad de colonización, optimiza su crecimiento vegetativo y se consigue mayor cantidad de título en el mismo volumen de soporte para la inoculación.

El producto objeto de la presente invención incorpora quitosano como fuente nutritiva para la cepa inoculada, compuesto que, en algunos casos, se utiliza por si solo en el control preventivo de fitopatógenos, (Chitomer, BCS Öko-Garantie QUIM\_MERI\_8244/01.04/4161-ES, Químicas Meristem. La presencia de quitosano en el inóculo induce la activación de la actividad quitinasa, enzima responsable de la degradación de quitina presente en la pared celular de algunos microorganismos patógenos como *F. oxysporum*, de

forma que cuando se produce una infección por patógenos, la actividad quitinasa generada previamente evitaría la instauración de estos en el suelo. La capacidad de biocontrol de este producto está en función del grado de acetilación, cuanto menor es éste mayor es su capacidad de biocontrol. No obstante su empleo directo no ofrece resultados concluyentes, puesto que, si bien en determinadas circunstancias tiene un efecto preventivo, en otras tiene un efecto activador de la infección del patógeno, ya que puede ser utilizado por éste como fuente de carbono y nutrientes.

10 Por tanto, la presente invención combina la incorporación de quitosano de bajo grado de acetilación, carbonato cálcico con la cepa de *T. harzianum*, inmovilizadas en un substrato sólido inerte a base de bentonita, que contiene fijadas estructuras tanto reproductivas como miceliares activas del hongo. Estos componentes se incuban durante un tiempo, previo a su preparación como inóculo, de manera que las densidades eficaces del microorganismo, así como de sus metabolitos (enzimas hidrolíticas), se mantienen durante el periodo de tiempo en el que la planta es susceptible de contraer la enfermedad. Todo ello permite optimizar el control biológico de cultivos de melón tanto en semillero como en campo, con la consecuente obtención de cultivos de calidad que mantienen y mejoran la calidad del suelo, con lo que en último término se evolucionará hacia una agricultura respetuosa con el medio ambiente y la salud de los seres vivos. Además todos los componentes utilizados para conseguir el formulado final son adecuados para su utilización en agricultura ecológica, por lo que el formulado propuesto permite controlar la fusariosis vascular de melón tanto en agricultura convencional como ecológica, mucho más restrictiva en cuanto insumos.

Para desarrollar la presente invención, en primer lugar se procedió a la selección y aislamiento del agente biocontrol a utilizar, en segundo lugar a estudiar su capacidad de supervivencia en los substratos orgánicos tipo turba habituales en semillero. En tercer lugar se procedió a desarrollar el soporte adecuado para implementar su acción tras la inoculación y, una vez seleccionados los aspectos anteriores, se procedió a mejorar la acción de *T. harzianum* mediante adición en el soporte de compuestos capaces de darle

una mayor y más rápida capacidad de acción, por último, se validó el producto final y se establecieron las condiciones de aplicación.

5 *Selección y aislamiento de cepas de Trichoderma. Evaluación de la capacidad biofungicida frente a Fusarium oxysporum. Estudio de supervivencia en turba*

Para la selección y aislamiento de microorganismos biofungicidas frente al fitopatógeno, se seleccionó el género *Trichoderma sp*, independientemente de su especie, por las excelentes cualidades para la lucha contra diversos hongos fitopatógenos, su capacidad bioestimulante y biorreguladora (Samuels, 10 1996), además de su adaptabilidad, facilidad de manejo y su alta capacidad de colonización (Hoitkin y Boehm, 1999). Una vez seleccionado el conjunto de cepas de *Trichoderma*, y realizados los ensayos para demostrar el grado de control sobre *F. oxysporum*, su capacidad de supervivencia y adaptación en los 15 sustratos tipo turba que se utilizan comúnmente en los semilleros, se procedió a elegir aquella que aunase ambas características.

Las cepas de *Trichoderma sp*, independientemente de su especie, se aislaron a partir de turbas, compost verdes y suelos del sureste español, evaluando un total de 11 cepas designadas T010, T1, T3, T10, T75, T76, T78, 20 T82, T85, T86 Y T190. También se ensayó un producto comercial que contenía *Trichoderma harzianum* y estaba recomendado para el control preventivo de la fusariosis vascular de melón (designado T comercial). Para realizar la evaluación las cepas se sometieron a las siguientes pruebas:

- (i) Evaluación de la capacidad biofungicida *in vitro* de las cepas de 25 *Trichoderma* frente a *F. oxysporum* mediante ensayo en placa dual, que consiste en enfrentamientos equidistantes de cuatro centímetros de las cepas aisladas frente a *F. oxysporum*, en placa petri en medio de cultivo PDA, cuantificando el crecimiento de este último con cada una de las cepas (Rupela *et al.*, 2003). Estos análisis mostraron que las cepas con 30 mayor capacidad biofungicida eran T78 y la T190 (Fig. 1 (A)) pero el crecimiento presentado por las diferentes cepas de *Trichoderma sp*. frente al patógeno en estudio (Figura 1 (B)) mostró la existencia de una cierta influencia negativa de *F. oxysporum* sobre el desarrollo de la cepa T190

hecho que hizo descartarla y seleccionar la cepa T1 debido a la gran capacidad de crecimiento presentada por esta cepa en presencia de *Fusarium oxysporum*.

- 5 (ii) Evaluación de la capacidad de crecimiento y supervivencia sobre turba, sustrato utilizado en los semilleros durante todo el proceso de germinación y crecimiento de las plántulas de melón. Este análisis se realizó incubando las cepas en turba con las condiciones habituales de germinación y crecimiento aplicadas al cultivo de melón. Los resultados pusieron de manifiesto que la cepa T78 presentaba mayor capacidad de crecimiento en este sustrato (Fig. 2 (A)).
- 10 (iii) Evaluación del estado y actividad de la cepa T78 en turba: para ello se analizó si su estado era en forma micelial o activa y/o en forma de esporas, es decir latente. La determinación del estado del microorganismo es importante a la hora de evaluar su actividad, ya que es posible que
- 15 tenga capacidad de supervivencia, pero que no sea activa y, por lo tanto, no desarrolle la actividad para la que se utiliza. Las esporas son estructuras de resistencia para la supervivencia del microorganismo, pero no son activas y es necesario que éstas germinen y den lugar al micelio para que se desarrolle su actividad (Papadivas y Lumsden, 1982; Harman, 2004). Para determinar la capacidad de germinación de las esporas de la cepa T78 inoculadas sobre turba se midió la respiración basal una vez inoculada, comparándola con la turba sin inocular con la cepa T78, mediante la medida del desprendimiento de CO<sub>2</sub>, en el medio inoculado como medida de su actividad (Pascual *et al.*, 2002). Los resultados
- 20 obtenidos mostraron que la cepa T78 tenía buena capacidad para germinar y desarrollarse en la turba.
- 25

De todo ello se concluyó que del conjunto de cepas aisladas la cepa T78 presentaba una gran capacidad de crecimiento y adaptación en turba, además

30 de presentar una mas que considerable capacidad biofungicida frente a *F. oxysporum*. El DNA de esta cepa fue extraído y secuenciado determinando que la cepa elegida, por homología de secuencia, pertenecía a la especie de *T. harzianum*, presentando algunas variaciones respecto a las incluidas en las

bases de datos genómicas, motivo suficiente para su registro en la Colección española de cultivos tipo bajo el N<sup>o</sup> 20714

5 *Estudio y desarrollo del soporte adecuado para la inoculación de la cepa de Trichoderma harzianum T78.*

Tras la selección de la cepa se procedió a la selección del soporte de inoculación más apropiado que permitiese a la cepa T78 permanecer el tiempo necesario en el sustrato en contacto con la planta y que impidiese la actuación del patógeno. Para llevar a cabo esta selección se analizaron dos soportes  
10 líquidos: disolución de la cepa de *Trichoderma* T78 en goma arábica y carboximetilcelulosa (CMC) al 2%, dos compuestos con la capacidad de conferir efecto impregnante, también se utilizó una suspensión de esporas de la cepa T78 obtenida a partir de cultivo en placa petri; y tres soportes sólidos:  
15 bentonita, vermiculita y salvado de trigo, que se prepararon embebiendo en ellos una solución de *Trichoderma* T78. También se utilizó vermiculita inoculada superficialmente, es decir vermiculita previamente inoculada con la suspensión de esporas que se incorporó en la parte superior de la bandeja y una suspensión de esporas pulverizada durante el cultivo.

El análisis de los soportes se realizó incorporándolos a la turba que se  
20 utilizó para germinar semillas de melón, sobre las que, una vez germinadas, se inoculó una suspensión de esporas del patógeno *F. oxysporum* a la concentración habitual de infección en semillero, que está entorno a  $10^3$ - $10^5$  ufc por gramo de turba (Agrios, 1998). Tras la infección se tomaron muestras sobre las que se evaluó el desarrollo de las plantas, la evolución de la población del  
25 patógeno (*Fusarium*) y de la cepa *T. harzianum* T78 inoculada con los distintos soportes. La toma de muestras se realizó a lo largo de todo el periodo habitual de cultivo de melón en semillero (48 días). Los resultados mostraron que los tratamientos en los que se produjo una mayor reducción de la población de  
30 *Fusarium* sp., fueron los tratamientos con bentonita, (tratamiento 4) y con vermiculita superficial (tratamiento 7) inoculada previamente con *T. harzianum* y aplicada superficialmente para recubrir los pocillos de las bandejas de siembra (Figuras 3, 4 y 5). La reducción en la población de *F. oxysporum* fue progresiva en el tiempo, siendo el tratamiento con bentonita el que presentó

una mayor eficacia, posiblemente debido a su capacidad de adherencia a las raíces lo que permite una mayor protección de *Trichoderma* sobre el sistema radicular de la planta. Asimismo, estos dos tratamientos fueron los que mostraron una mejor evolución de la cepa de *T. harzianum* T78 ya que presentaron el número más elevado de ufc/g, destacando el tratamiento con bentonita que mostró mayor concentración de *T. harzianum* al final del experimento (Fig. 4). También se analizó el efecto de los distintos soportes utilizados sobre el desarrollo de las plantas al final del cultivo en semillero y su efecto sobre el posible riesgo de movimiento de patógeno de semillero a campo al trasplantar plantas sin síntomas, pero portadoras del patógeno, al campo de cultivo. En todos los casos los tratamientos que mostraron menor porcentaje de infección fueron los que incluían bentonita y vermiculita como soporte del inóculo.

Por tanto, de los soportes utilizados para inocular la cepa *T. harzianum* T78 en la turba, tanto líquidos como sólidos, los más efectivos fueron los sólidos, en particular bentonita y la vermiculita aplicada superficialmente, fundamentalmente debido a la capacidad de estos de protección de los microorganismos inoculados en el sustrato. Estos tratamientos, además de tener un efecto biocontrol tienen un efecto bioestimulante y biofertilizante sobre las plantas no infectadas por *F. oxysporum*.

#### *Incorporación de factores que mejoran la capacidad biocontrol de la cepa de T. harzianum T78*

Tras la selección de la cepa y el soporte a utilizar: bentonita, se procedió a incorporar otros factores al producto objeto de la invención que permitiesen aumentar la capacidad de supervivencia de *T. harzianum* y su efecto antagonista frente a microorganismos patógenos, especialmente frente a *F. oxysporum*. Para ello se corrigió el pH de la bentonita mediante la adición de carbonato cálcico natural que eleva el pH consiguiendo un pH más adecuado para el desarrollo de la cepa de *T. harzianum* T78.

Otro factor que mejora la actividad biocontrol del producto objeto de la invención es el quitosano, que induce una respuesta inmediata por parte de *T. harzianum*, debido al aumento en la producción de enzimas tipo quitinasa,

enzima responsable de la degradación de la pared celular del patógeno. La incorporación de quitosano durante el proceso de inmovilización de la cepa T78 en bentonita, evita el que éste pueda ser utilizado por el microorganismo patógeno, como ocurre en los casos en que se utiliza directamente, puesto que cuando el producto final vaya a ser inoculado, el quitosano habrá sido ya utilizado por *T. harzianum*. De este modo se consigue que cuando *T. harzianum* sea inoculado este pueda presentar un “micro-nicho” ecológico tanto por las condiciones de pH y la presencia de compuestos orgánicos capaces de ser utilizados, como por la protección física por la arcilla, que mejorarán su supervivencia y aseguran la acción para la que se ha inoculado.

Una vez establecido el producto prototipo se procedió a validar el mismo a escala comercial para lo cual se estableció el volumen mínimo necesario, se optimizó la dosificación del mismo en la turba y las condiciones de aplicación.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención pero no deben considerarse en sentido limitativo de la misma.

Los experimentos se llevaron a cabo en unos semilleros comerciales, aplicando las condiciones habituales de germinación y crecimiento utilizadas para el cultivo de melón.

#### 20 EJEMPLO N°1.

##### Selección y aislamiento de la cepa de *T. harzianum* T78. Evaluación de su capacidad biofungicida frente a *F. oxysporum* y supervivencia en turba

Para seleccionar la cepa de *Trichoderma* más adecuada se aislaron cepas de diferentes fuentes: turbas, compost, suelos agrícolas y forestales. También se estudiaron algunas cepas aisladas previamente por el grupo de Investigación. Se ensayaron un total de 11 cepas, designadas T010, T1, T3, T10, T75, T76, T78, T82, T85, T86 y T190. Así como un producto comercial que contenía *Trichoderma* sp., designado T comercial. En el etiquetado del producto se indicaba su composición y se recomendaba su aplicación para el control preventivo de la fusariosis de melón, entre otros.

Se evaluó la capacidad fungicida de las cepas frente a *F. oxysporum* para lo que se utilizó un aislado de *F. oxysporum* f. sp. *Melonis* raza 1,2 (De Cara *et al.*, 2004) obtenido de plantones diversos capaces de manifestar la

5 fusariosis de melón, se eligió la que presentaba una virulencia alta-muy alta, con el fin de que la manifestación de la enfermedad no fuese factor limitante en la experimentación, esta cepa fue la que se utilizó en los siguientes ejemplos. La evaluación se realizó mediante cultivo dual, que permite determinar las

10 habilidades de las distintas cepas de *Trichoderma* sp. a la hora de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum*. El ensayo de cultivo dual consiste en enfrentamientos equidistantes de cuatro centímetros de las cepas aisladas frente a *Fusarium oxysporum*, en placa petri en medio de cultivo PDA, cuantificando el crecimiento de este último con cada una de las cepas (Bell et

15 Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla1 y en la Figura 1. Las cepas que presentaron mayor capacidad biofungicida fueron las cepas T1 y T78 (Figura 1).

15 Tabla 1. Capacidad biofungicida de las diferentes cepas de *Trichoderma* frente a *Fusarium oxysporum* (grado de capacidad biofungicida de las cepas de *Trichoderma* de menor a mayor: -, +/-, +, ++, +++)

Cepa de <i>Trichoderma</i> sp.	Capacidad biofungicida
T010	+
T1	+++
T3	+
T10	+/-
T75	+/-
T76	+
T78	+++
T82	++
T85	+/-
T86	+
T190	++
T comercial	-

20 A continuación se evaluó la capacidad de crecimiento y supervivencia en turba de las cepas, para determinar cuales eran capaces de crecer en turba y cual de



ellas lo haría con mayor rapidez y eficacia. Para ello se prepararon varios recipientes con turba y se inocularon con las distintas cepas, pasados 48 días, que es el tiempo de permanencia de las plantas de melón en semillero, desde su germinación hasta su disposición en el campo, se procedió a realizar el  
5 recuento de los microorganismos presentes en la turba. Los resultados mostraron que la cepa T78 presenta mayor capacidad de crecimiento en turba, mientras que las cepas T1 y T comercial presentan la menor capacidad de crecer en este sustrato (Figura 2). La cepa T1, a pesar de presentar una gran capacidad biofungicida, mostró una muy baja capacidad de crecimiento en  
10 turba; por este motivo fue descartada y se optó por la cepa T78 que presentó la mayor capacidad de inhibir a *F. oxysporum* y la mayor capacidad de crecer sobre turba.

El DNA de esta cepa fue extraído y secuenciado determinando que la cepa elegida, por homología de secuencia, pertenecía a la especie de *T. harzianum*,  
15 presentando algunas variaciones respecto a las incluidas en las bases de datos genómicas, motivo suficiente para su registro en la Colección española de cultivos tipo bajo el N° de registro 20714.

Para completar la selección de la cepa de *T. harzianum* se determinó su estado y su actividad mediante la medida de la respiración en el medio  
20 inoculado como respuesta a la actividad del inóculo. Para ello se prepararon recipientes con turba estéril al 60% de su capacidad de retención hídrica, adicionando una suspensión de esporas de la cepa T78 equivalente a  $10^7$  ufc por gramo de turba, se incubaron a 28° C, y se determinó la cantidad de CO<sub>2</sub> desprendido de forma periódica durante 25 días, el desprendimiento de CO<sub>2</sub> es  
25 una medida de actividad biológica del microorganismo inoculado (Pascual *et al.*, 2002). Estos análisis mostraron que la cepa T78 era capaz de germinar y desarrollarse en la turba, con alto nivel de adaptación a ésta, pues después de un corto periodo de tiempo (7 días), presentó el máximo de respiración, disminuyendo su actividad con el tiempo debido a la consumición de los  
30 nutrientes, llegando a un equilibrio en el resto del tiempo de incubación (Figura 2 (B)).

Selección de bentonita como soporte de inoculación de *T. harzianum*.

Una vez seleccionada la cepa de *T. harzianum*, se procedió a estudiar la forma de inoculación que resultara más adecuada para facilitar su incorporación a la turba, que permitiera dotar a las plantas de una protección suficiente frente a los fitopatógenos. La suspensión de esporas se preparó mediante cultivo de la cepa en placa petri con PDA durante 7 días, tras lo cual se recogieron las esporas de la superficie de las placas con agua destilada, realizando un recuento de esporas totales mediante hematocitómetro en cámara Neubauer, este recuento resultó entorno a  $10^8$ - $10^9$  ufc de la cepa T78 por mililitro. A continuación, estas esporas se inmovilizaron utilizando dos tipos de soportes de inoculación:

1) Soportes Líquidos: se utilizó una solución de *T. harzianum* T78 tal cual, obtenida a partir de cultivo en placa petri y soluciones de esporas disueltas o bien en goma arábica y o en carboximetilcelulosa (CMC), al 2%, con el fin de conferir efecto impregnante a la solución de *T. harzianum*. La goma arábica y la CMC se inocularon directamente en la semilla, dada su capacidad de fijación, al actuar como sustancias cementantes, mientras que la suspensión de esporas se inoculó en la turba en el momento anterior a la preparación de las bandejas de poliestireno para la germinación y crecimiento de las plántulas de melón. Una vez inoculadas las semillas y secadas durante 7 días para estabilizar el inóculo, se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias de la cepa T78, mediante PDA-rosa bengala por semilla, que resultó de  $10^4$  ufc de la cepa T78, y que coincide con el grado de inoculación de cada uno de los pocillos de las bandejas de poliestireno. Para el caso de la inoculación líquida directa de la suspensión de esporas en la turba, se calculó la cantidad de inóculo necesario para que la cantidad final por gramo de turba estuviese en el rango de  $10^6$ - $10^7$  ufc de la cepa T78.

2) Soportes Sólidos: bentonita natural, vermiculita y el salvado de trigo sobre los que se embebió la suspensión de esporas de la cepa de *T. harzianum* T78, obtenidas siguiendo el método anteriormente propuesto. Para la preparación de estos soportes se les incorporó una suspensión de esporas de la cepa de *T. harzianum* T78, de forma que el contenido final de esporas por gramo de

- soporte sólido fuese igual. Una vez estabilizados en los substratos sólidos, cuya duración aproximada es de 10-15 días, y cuantificado el número de ufc por gramo de substrato mediante PDA-rosa bengala, los inóculos se mezclaron con la turba para que la cantidad de inóculo estuviese en el rango de  $10^6$ - $10^7$  ufc de la cepa T78 por gramo de turba.
- También se utilizó vermiculita inoculada superficialmente, es decir vermiculita previamente inoculada con la suspensión de esporas que se incorporó en la parte superior de la bandeja y una suspensión de esporas pulverizada durante el cultivo.
- El experimento constó de 8 tratamientos y 2 controles, cada uno con cinco réplicas, sobre bandejas de poliestireno utilizada en la germinación y crecimiento de plántulas en semillero, cada una de ellas con 150 plántulas de melón. Durante los ensayos preliminares se utilizó la variedad de melón tendral, por su elevada susceptibilidad a *F oxysporum*. Una vez desarrollado el protocolo del prototipo, este fue testado sobre otras variedades comerciales para lo que se eligieron aquellas más utilizadas y sensibles al ataque del patógeno según el Vademécum de semillas hortícolas (Portagrano 2003-2004). Los distintos tratamientos se sometieron a las condiciones habituales de semillero, con la única diferencia del soporte seleccionado para la inoculación de la cepa de *T. harzianum* T78. Con el fin de poder evaluar el efecto biocontrol, se duplicó el experimento, infectando una mitad con la misma cepa que en el ejemplo 1 y la otra se mantuvo sin infectar para poder detectar el efecto de los soportes líquidos o sólidos aplicados en el desarrollo de la planta de melón sin presión de patógeno introducido.
- El inóculo de la cepa *T. harzianum* T78 fue de  $10^6$ - $10^7$  ufc por gramo de turba en todos los tratamientos. Estas concentraciones son las más ampliamente utilizadas en la bibliografía (Batta, 2004). La única excepción fueron los tratamientos con soportes 1, 2 y 3 (solución de esporas líquida, CMC y Goma Arábica) debido a su peculiaridad de inoculación, por adhesión a las semillas de melón, por lo que no fue posible alcanzar estos niveles, alcanzando  $10^4$  ufc por gramo de turba. En todos los casos una vez preparados los inóculos se procedió a su recuento en PDA-rosa bengala, comprobando que el nivel de ufc

era el adecuado para que al inocular sobre la turba estuviese en el rango establecido.

Tabla 2. Nomenclatura establecida para los distintos tratamientos

Soportes utilizados		Sin Fusarium	Con Fusarium
<b>LÍQUIDOS</b>			
Suspensión de esporas	1	1 A	1 C
Carboximetilcelulosa (CMC)	2	2 A	2 C
Goma Arábica	3	3 A	3 C
<b>SÓLIDOS</b>			
Bentonita	4	4 A	4 C
Vermiculita mezclada	5	5 A	5 C
Salvado de trigo	6	6 A	6 C
Vermiculita superficial	7	7 A	7 C
Turba sola	Control		
Turba + <i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> sp. (X)		
Turba abonada por los semilleros	T		

5

Una vez preparados los diferentes soportes inoculados con *T. harzianum* se mezclaron con turba. Cada tratamiento se colocó en bandejas de poliestireno de 150 pocillos cada una y seguidamente fueron sembradas con semillas de melón, recubiertas con vermiculita y humedecidas. Las bandejas sembradas se colocaron en cámara de germinación comercial acondicionada para la germinación del melón, a una temperatura de 25° C y humedad del 75%, pasados dos días se sacaron de la cámara de germinación y se extendieron en el semillero.

A los 15 días de haber sacado las bandejas de la cámara de germinación, y coincidiendo con la aparición de la segunda hoja verdadera de la plántula de melón, las bandejas seleccionadas para el tratamiento con el fitopatógeno (tratamientos C) se inocularon con una suspensión de esporas de *F. oxysporum* para que la cantidad en cada uno de los pocillos, estuviese entorno a 10<sup>4</sup> ufc por gramo de turba (dosis de infección habitual en semillero).

15

Sobre el material orgánico (turba) se realizaron un total de cuatro muestreos periódicos para conocer la evolución de las poblaciones de los microorganismos inoculados: cepa *T. harzianum* T78 y *F. oxysporum*. Las muestras se sometieron a análisis microbiológicos mediante el medio selectivo correspondiente (Papavizas *et al.*, 1982 y Komada, 1975, respectivamente).  
5 Sobre el material vegetal recolectado se analizó el tamaño de las hojas, la longitud y el peso del tallo. También se evaluó el porcentaje de infección de las plántulas de melón mediante siembra de una porción de tallo de melón, con una longitud de 1 cm previamente esterilizada, sobre un medio general de hongos (PDA), tomándose como tallos positivos aquellos que tras cinco días de  
10 incubación presentaran crecimiento de *F. oxysporum* a su alrededor.

Los tratamientos en los que se produjo una mayor reducción de la población de *F. oxysporum*, fueron los tratamientos en los que el soporte lo constituía bentonita (tratamiento 4) y vermiculita aplicada superficialmente para recubrir los pocillos de las bandejas de siembra (tratamiento 7), ambos  
15 inoculados con la cepa T78 (Figuras 3, 4 y 5). La reducción en la población de *F. oxysporum* fue progresiva en el tiempo, si bien el que presentó una mayor rapidez en la disminución de las mismas en la turba fue el tratamiento con bentonita, posiblemente debido a su capacidad de adherencia a las raíces,  
20 permitiendo así una mayor protección sobre el sistema radicular de la planta.

En cuanto a la evolución de la cepa de *T. harzianum* T78, los tratamientos con bentonita (tratamiento 4) y vermiculita superficial (tratamiento 7) presentaron el número más elevado de ufc, destacando de forma significativa el tratamiento 4 que mostró un mayor número de ufc de la cepa *T. harzianum* T78 al final del estudio (Figura 4). A lo largo del tiempo la cepa *T. harzianum* T78 mostró una disminución del 50 % en los tratamientos 1 (inoculación esporular), 4 (bentonita) y 7 (vermiculita superficial); si bien el  
25 tratamiento 1, a pesar de mostrar un comportamiento similar en cuanto a la supervivencia de la cepa *T. harzianum* T78, su efecto sobre *Fusarium oxysporum* fue menor que en los tratamientos 4 y 7, lo que indica que las esporas no han germinado y por tanto no han podido desarrollar la actividad antagónica frente a *F. oxysporum*. Lo que pone de manifiesto la importancia del soporte y del nivel de inóculo presente en el efecto sobre *F. oxysporum*. En el  
30

resto de tratamientos, la cantidad de inóculo existente, tan solo después de dos días, era del 1% del valor inoculado. Los tratamientos en los que la cepa de *T. harzianum* T78 se embebió en la semilla, a pesar de que el descenso observado fue menos pronunciado, dado que no fue posible alcanzar un nivel de inóculo elevado, éste no fue suficiente para el control de *F. oxysporum* (Fig. 3, 4 y 5). Con el paso del tiempo, se observa que las poblaciones de la cepa de *T. harzianum* T78 capaces de sobrevivir los primeros dos días después de la inoculación muestran una mayor capacidad de adaptación, puesto que el descenso observado es menos pronunciado en los distintos tratamientos, destacando la capacidad de supervivencia de la cepa *T. harzianum* T78 inmovilizada con bentonita que no presenta disminución alguna. También es de destacar como la inoculación en forma esporular (tratamiento 1), que en los primeros 15 días se mantenía en niveles similares a los tratamientos 4 y 7, presentó una evolución descendente a partir de los 37 días (Fig. 4), lo que vuelve a poner de manifiesto la necesidad de un soporte sólido que permita al microorganismo mantenerse y evitar las pérdidas por lavado durante el riego diario que se aplica a los semilleros. Esto explica que a los 15 días las ufc de *F. oxysporum* eran mayores en la turba tratada con este último tratamiento que en la tratada con los tratamientos 4 y 7, debido a que posiblemente *T. harzianum* estaba latente en forma de spora, sin posibilidad de germinar y por tanto sin capacidad de controlar al patógeno.

Del conjunto de plantas que no mostraban síntomas aparentes de afección por *F. oxysporum*, se tomaron 20 en cada uno de los puntos de muestreo (a los 15, 33 y 48 días) para evaluar el porcentaje de infección de las plantas que iban a ser transplantadas y el potencial riesgo de movimiento de patógeno de semillero a campo (Figura 6B). De nuevo, los tratamientos con menor porcentaje de infección fueron aquellos en los que el soporte del inóculo lo constituían bentonita, si bien el porcentaje de infección mostró un aumento considerable en el transcurso de la última fase del cultivo, lo que sugiere la necesidad de complementar la cepa de *T. harzianum* T78 de alguna forma con el fin de que el control de la infección pueda mantenerse durante todo el tiempo de cultivo en semillero, evitando así la salida de plantas del mismo que, sin presentar síntomas aparentes, sean portadoras del patógeno.

Tras los 48 días de la periodo habitual de cultivo de las plántulas de melón en semillero, se pesaron 20 plantas de cada uno de los tratamientos, observando que el desarrollo de las plantas a las que se les había aplicado la cepa *T. harzianum* T78, bajo presión de *F. oxysporum* fue mayor en los  
5 tratamientos con bentonita y vermiculita superficial, mientras que el resto presentó un peso similar al control, mostrando todos ellos síntomas de afección además de clorosis, y manchas necróticas en las hojas (Figura 6A).

Las plantas tratadas con la cepa *T. harzianum* T78, sin presión adicional de patógeno, en general, presentaron un mayor peso y por tanto mayor  
10 desarrollo que las plantas sin inocular, de nuevo los tratamientos 1, 4 y 7 fueron los que mostraron los mejores resultados, lo que demuestra que el inóculo además de tener un efecto biocontrol, también presenta efectos biofertilizantes y/o bioestimulantes a tener en cuenta.

### 15 EJEMPLO N° 3.

#### Mejora de la capacidad biocontrol de la cepa de *T. harzianum* T78 en bentonita complementada con carbonato cálcico y con quitosano como fuente de inducción de la actividad

Una vez seleccionada la bentonita como soporte óptimo para la inoculación  
20 de la cepa de *T. harzianum* T78, se procedió a mejorar su capacidad biocontrol mediante la incorporación de carbonato cálcico (CO<sub>3</sub>Ca) y quitosano de bajo grado de acetilación, incubando la cepa de *T. harzianum* T78 en estas condiciones a 25-28° C durante 5 días, previo a la preparación del producto, al igual que se ha descrito anteriormente. Con este tratamiento se potencia por un  
25 lado el crecimiento de la cepa de *T. harzianum* T78, al conseguir un pH próximo a 7, su óptimo de crecimiento, mediante adicción de CO<sub>3</sub>Ca al 5% y por otro la inducción de la producción de quitinasas por *T. harzianum*, con la presencia de quitosano. Las quitinasas son enzimas responsables de la degradación de quitina presente en la pared celular de algunos  
30 microorganismos patógenos como *F. oxysporum*, parte de estas enzimas quedarían inmovilizadas en la bentonita, junto a las estructuras reproductivas y miceliares de *T. harzianum* de forma que cuando se produjera una infección

por patógenos, la actividad quitinasa generada previamente ayudaría a su control.

Para ello, en primer lugar se calculó la cantidad de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  necesario para subir el pH hasta 7, incorporando distintas cantidades desde 1 a 20 gramos por cada 100 gramos de bentonita (Tabla 3). Se evaluó su incidencia sobre el aumento en la población de la cepa de *T. harzianum* T78, en turba en condiciones de semillero. También se evaluó su efecto sobre la germinación y crecimiento de plántulas de melón ya que puede estar afectado por el aumento de la conductividad eléctrica con el  $\text{CO}_3\text{Ca}$ . El valor óptimo encontrado fue de 5 gramos de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  por cada 100 gramos de bentonita, puesto que a partir de este valor se observó una disminución del desarrollo vegetal. La incidencia de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  sobre la cepa de *T. harzianum* T78 fue positiva, produciendo un aumento superior a un orden de magnitud (Tabla 3).

Tabla 3. Determinación de la cantidad de carbonato cálcico a incorporar.

	Cantidad de carbonato cálcico por cada 100 gr. bentonita						
	Control	1 g.	2 g.	3 g.	5g	10 g.	20 g.
pH	5.37	6.65	6.78	6.82	6.99	7.01	7.3
CE ( $\text{mS cm}^{-1}$ )	678	754	766	786	792	800	850
Peso seco planta (g.)	0.136	0.135	0.135	0.136	0.135	0.104	0.102
T78 ( $\text{ufc (10}^6\text{) g}^{-1}$ )	0.5	0.6	10.1	15.5	30.6	38.3	40.3

La cantidad de quitosano se determinó añadiendo distintas cantidades desde 1 a 20 gramos por cada 100 gramos de bentonita (Tabla 4), la mezcla se preinoculó con la cepa de *T. harzianum* T78, como en los experimentos anteriores, con la salvedad de que se incubó a 25-28° C durante 5 días para permitir el desarrollo de *T. harzianum* en el soporte junto con el quitosano. Posteriormente se realizó un ensayo en turba, inoculando las distintas mezclas, evaluando su incidencia sobre el aumento en la población de la cepa de *T. harzianum* T78 y su efecto sobre la germinación y crecimiento de plántulas de



melón. La cantidad máxima de quitosano a inocular sin producir incidencia negativa sobre la planta fué de 5 gramos por 100 gramos de bentonita. La incorporación de quitosano produjo un aumento considerable de crecimiento de la cepa de *T. harzianum* T78 (Tabla 4).

5

Tabla 4. Determinación de la cantidad de quitosano a incorporar.

	Cantidad de quitosano por cada 100 g. Bentonita				
	Control	1 g.	5 g.	10g.	20g
% germinación	100	99	98	70	65
Peso fresco planta (g.)	0.143	0.142	0.134	0.112	0.105
T78 (ufc ( $10^6$ ) g <sup>-1</sup> )	0.5	0.6	10.1	11.5	16.6

Una vez establecidos los valores máximos de CO<sub>3</sub>Ca (5 gramos) y quitosano (5 gramos) se procedió a ensayarlos de forma conjunta bajo presión de *F. oxysporum*, siguiendo el modelo de trabajo ya descrito anteriormente: una vez preparado el inoculo en bentonita, CO<sub>3</sub>Ca y quitosano, se mezcló con turba, se rellenaron bandejas de poliestireno de 150 pocillos y se sembraron las semillas de melón. En este caso además de utilizar la variedad tendral de melón se utilizaron otras variedades comerciales que se caracterizan por ser mas susceptibles al ataque de *F. oxysporum*. Una vez sembradas, las bandejas se colocaron en cámara de germinación acondicionada y pasados dos días se sacaron de la cámara de germinación y llevaron al semillero donde se extendieron. A los 15 días de haber sacado las bandejas de la cámara de germinación, y coincidiendo con la aparición de la segunda hoja verdadera de la plántula de melón, las bandejas seleccionadas para el tratamiento con el fitopatógeno se inocularon con una suspensión de esporas de *F. oxysporum* para que la cantidad en cada uno de los pocillos fuese de  $10^3$ - $10^4$  ufc por gramo de turba (dosis de infección habitual en semillero). Sobre el material orgánico (turba) se realizó un análisis final para conocer la evolución de las poblaciones de los microorganismos inculados: cepa *T. harzianum* T78 y *F. oxysporum* (Papavizas *et al.*, 1982 y Komada, 1975, respectivamente). Sobre el material vegetal recolectado se analizaron el tamaño de las hojas, la longitud y

25

el peso del tallo. También se evaluó el porcentaje de infección de las plántulas de melón mediante siembra de una porción de tallo de melón, con una longitud de 1 cm previamente esterilizada sobre un medio general de hongos (PDA), tomándose como tallos positivos aquellos que tras cinco días de incubación presentaran crecimiento de *F. oxysporum* a su alrededor. Los resultados obtenidos mediante la inoculación de la cepa de *T. harzianum* T78 en bentonita con CO<sub>3</sub>Ca y quitosano todo ello incubado previamente a la aplicación, demostraron un aumento en el peso seco de las plantas de melón al final del experimento en comparación con la turba, significativamente mayor al obtenido con la inoculación de la cepa de *T. harzianum* T78 con bentonita únicamente (Figura 6(A)). El porcentaje de tallos infectados en la turba tratada con la cepa de *T. harzianum* T78 en bentonita previamente incubada con carbonato cálcico y quitosano mostró un considerable descenso (20%) en comparación con la tratada con la cepa de *T. harzianum* T78 en bentonita únicamente (50%) (Figura 6(B)), lo que pone de manifiesto la mejora en la capacidad de controlar el ataque de *F. oxysporum*. La adición de quitosano y CO<sub>3</sub>Ca a la bentonita muestra una mejora en la población de *T. harzianum* T78, que está íntimamente relacionada con la disminución de las poblaciones de *F. oxysporum* en dos ordenes de magnitud de lo conseguido con bentonita únicamente (Figura 7 (A) y (C)). Es de destacar que el aumento de la cepa de *T. harzianum* T78 no es tan destacado, como la disminución de *F. oxysporum* lo que pone de relieve de nuevo la importancia de la combinación propuesta, que mantiene la actividad frente a *F. oxysporum* de forma mas efectiva, debido a la capacidad de mantener en su estructura las quitinasas producidas durante la incubación de *T. harzianum* con la mezcla de bentonita, CO<sub>3</sub>Ca y quitosano.

#### EJEMPLO N<sup>o</sup>4.

##### Validación del producto y condiciones de aplicación

Una vez establecido el producto prototipo se procedió a validar el mismo a escala comercial para lo cual se estableció el volumen mínimo necesario, se optimizó la dosificación del mismo en la turba y las condiciones de aplicación.

Para ello se partió de un volumen equivalente a 500 kg de bentonita comercial, 50 litros de suspensión de esporas de *T. harzianum* T78 ( $3 \times 10^9$  ufc /

ml), 25 kg de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  y 25 kg de quitosano. Se mezclaron en seco los 500 kg de bentonita con los 25 kg de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  y 25 kg de quitosano, y una vez homogenizada la mezcla, se procedió a incorporar los 50 litros de la suspensión de esporas. Con el fin de incorporarla de forma homogénea, esta  
5 solución de esporas se disolvió en agua destilada en una proporción 1:10, de forma que la mezcla final tuviera la suficiente humedad para permitir una buena homogenización, y estuviera suficientemente hidratada para permitir el desarrollo y crecimiento de las esporas incorporadas durante los 5 días de incubación a 25-28°C. Después de la incubación, el producto obtenido, tenía  
10 una concentración de *Trichoderma harzianum* T78 de  $1,3 \cdot 10^8$  ufc por gramo de bentonita, se dejó secar hasta un 10-15% de humedad con el fin de poder triturar el producto y embasarlo, para su posterior incorporación en la turba, obteniendo una concentración de *Trichoderma harzianum* T78 de  $0,3 \cdot 10^8$  ufc por gramo de bentonita.

15 El inóculo obtenido se utilizó en la turba en la proporción del 10% con el fin de obtener en el sustrato T78 de  $10^7$  ufc de *Trichoderma harzianum* T78 por gramo de turba. Para ello se realizó una mezcla del inóculo (bentonita+ $\text{CO}_3\text{Ca}$  +quitosano+Trichoderma) en la turba mediante el uso de una mezcladora característica de semillero, durante al menos 15 minutos para  
20 asegurar la distribución homogénea del inóculo en la turba. A partir de este momento, el tratamiento del sustrato inoculado fue el realizado de forma rutinaria y automatizada de un semillero comercial: llenado de bandejas de poliestireno de forma automática con el sustrato, siguiendo de la siembra de las semillas de melón, humectación, incubación en cámara oscura y extensión  
25 de bandejas en el semillero. Las variedades de melón ensayadas fueron la utilizada en el experimento (Tendral), así como variedades híbridas susceptibles al ataque de *Fusarium oxysporum* (Giotto (Ramiro Arnedo)), (Doral y Cyrano (Séminis)).

El volumen total de bandejas ensayadas fue de 1000, cada una de ellas  
30 con 150 alvéolos, donde 500 bandejas se llenaron con la mezcla turba-producto inoculado y la otra mitad con la misma turba sin el producto, realizándose a esta última los tratamientos fitosanitarios característicos con fungicidas específicos frente a la fusariosis.

En este experimento, se buscaron las condiciones más propicias para el desarrollo de la fusariosis vascular en melón a nivel de semillero, si bien por el volumen del experimento y la necesidad de estudiar la eficacia del producto en condiciones de semillero reales, no se infectaron con el patógeno. Los resultados obtenidos (Tabla 5) demostraron la eficacia de la inoculación en cuanto al porcentaje de infección con patógeno, ufc de *Fusarium oxysporum* en el sustrato, además de demostrar un mayor crecimiento de las plantas no afectadas, debido al efecto bioestimulante y biofertilizante de la cepa de *Trichoderma* utilizada. Todo ello, viene a demostrar que el uso de este inóculo no solo beneficia en cuanto al control de la fusariosis de melón sino también a un menor tiempo de estancia de la plántula de melón en semillero, con el consiguiente ahorro económico.

Tabla 5. Porcentaje de infección y peso fresco de plantas no afectadas en el experimento

	Variedad de melón ensayada			
	Tendral	Giotto.	Doral.	Cyrano.
	Turba inoculada <i>T harzianum</i> T78			
% infección de <i>F oxysporum</i>	25	20	15	22
Peso fresco de planta no afectada (g)	0,130	0,180	0,167	0,155
	Turba sin inocular			
% infección de <i>F oxysporum</i>	35	40	17	19
Peso fresco de planta no afectada (g)	0,100	0,150	0,152	0,132

## Bibliografía

Agrios, G. (1998). *Fitopatología*, 3ª edición. México: Limusa.

Batta, Y.A. (2004). Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold. *International journal of food microbiology*, 96(3), 281-288.

Bell, D.K.; Wells, H.D. y Markham, C.R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against 6 fungal plant-pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379-382.

De Liñan, C. (2005). *Eco vad, productos e insumos para agricultura ecológica 1ª edición*. Madrid: Ediciones aerotécnicas, S.L. pp 70-77

ES 2109182, (07.11.1995). *Formulación líquida a base de cepas del hongo Trichoderma harzianum y Trichoderma viride*. Universidad de  
5 Salamanca; Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

ES 2200602, (28.04.2000). *Componente que comprende hongos del género Trichoderma útil como agente de control biológico y sus aplicaciones*. Universidad de Salamanca; Newbiotechnic, S.A.

ES 2219523, (01.12.2004). *Componente que comprende hongos del  
10 género Trichoderma útil como agente de control biológico y sus aplicaciones*. Newbiotechnic, S.A.; Universidad de Salamanca.

Harman, G.E. (2004). *Trichoderma* spp., Including *T. Harzianum*, *T.viride*, *T. Koningil*, *T. Hamatum* and other spp. *Deuteromycetes, moniliales* (asexual classification system). Cornell University, Geneva, NY 14456.

15 Hoitink, H.A.J. y Boehm, M.J. (1999). Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology*, (37), 427-446.

IL 2103758, (01.10.1997). *Nuevo aislado de Trichoderma harzianum, T-39, compuestos fungicidas que contienen este aislado y su uso contra B. cinerea y S. sclerotiorum*. Peri development applications (1985) LTD.; Yissum research development company of the Hebrew University of Jerusalem.  
20

Inbar, J.; Abramsky, M.; Cohen, D. y Chet, I. (1994). Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *European Journal of plant  
25 pathology*, 100(5), 337-346.

Komada, H. (1975). Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev Plant Prot Res* (8): 114-125.

Marín Rodríguez, J. (2003, 2005). *Portagrano vademecum de variedades hortícolas, 7ª y 8ª edición*. Madrid: Mundi-Prensa.

Papavizas, G.C. y Lumsden, R.D. (1982). Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp from soil. *Plant disease*, 66(11), 1019-1020.

5

Pascual, J.A.; García, C.; Hernández, T.; Lerma, S. y Lynch, J.M. (2002). Effectiveness of municipal waste compost and its humic fraction in suppressing *Pythium ultimum*. *Microbial ecology*, 44(1), 59-68.

10

Rupela, O.P.; Gopalakrishnan, S.; Krajewski, M. y Sriveni, M. (2003). A novel method for the identification and enumeration of microorganisms with potential for suppressing fungal plant pathogens. *Biology and fertility of soils*, 39(2), 131-134.

Samuels, G.J. (1996). *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *Mycological research*, 100(8), 923-935 .

15

Trillas, M.I.; Cotxarrera, L.; Casanova, E. y Cortadillas, N. (2000). Ultrastructural changes and localization of chitin and callose in compatible and incompatible interactions between carnation callus and *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56(3), 107-116.

20

US 4,900,348,(Febrero 1987). *Production of disease supresive compost and container media, and microorganism culture for use therein*. Hoitink, H.A..

US 0285987, (Octubre 1988). *Fused control agents*. Harman Gary, E; Stasz Thomas, E; Weeden Norman F..

US 6,808,917 (Febrero 2002). *Controlling plant pathogens with fungal/bacterial antagonist combinations*. Johnson, T.D.

## REIVINDICACIONES

1. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón caracterizado porque comprende los siguientes componentes:
  - (i) Un microorganismo antagonista de *F. oxysporum* con capacidad biocontrol sobre éste.
  - (ii) Un soporte sólido para la inoculación del microorganismo antagonista.
  - (iii) Factores adicionales que mejoran la capacidad biocontrol del producto.
2. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación 1 caracterizado porque como dicho microorganismo antagonista (i) se utiliza una especie del género *Trichoderma* con capacidad biocontrol sobre *F. oxysporum*.
3. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación anterior caracterizado porque dicho microorganismo antagonista (i) es una cepa de *T. harzianum* aislada de turbas, compost verdes o suelos.
4. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación anterior caracterizado porque como dicho microorganismo antagonista (i) se utiliza la cepa T-78 de *T. harzianum* N° CECT 20714
5. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación anterior caracterizado porque dicha cepa de *T. harzianum* CECT 20714 se inocula para que resulte una concentración final de  $10^6$ - $10^7$  ufc por gramo de turba.
6. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación 1 caracterizado porque como dicho soporte sólido (ii) para la inoculación del microorganismo se usa cualquiera de los comprendidos entre diversos tipos de arcillas naturales como la bentonita, vermiculita bien mezclada o inoculada superficialmente o el salvado de trigo.
7. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación anterior caracterizado porque como dicho

- soporte sólido (ii) para la inoculación del microorganismo se utiliza bentonita.
8. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación 1 caracterizado porque como dichos factores adicionales (iii) para mejorar la capacidad biocontrol del producto se utilizan correctores de pH, para obtener un pH final en el producto próximo a 7, entre 6 y 8.
9. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación anterior caracterizado porque como dicho factor (iii) corrector de pH se utiliza  $\text{CO}_3\text{Ca}$ .
10. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación anterior caracterizado porque como dicho corrector de pH (iii) se utiliza  $\text{CO}_3\text{Ca}$  a una concentración entre 1 y 20 gramos por 100 g de bentonita.
11. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación anterior caracterizado porque como dicho corrector de pH (iii) se utiliza  $\text{CO}_3\text{Ca}$  a una concentración de 5 gramos por 100 g de bentonita.
12. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación 1 caracterizado porque como dichos factores adicionales (iii) para mejorar la capacidad biocontrol del producto se utilizan inductores de la biosíntesis de quitinasas.
13. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación anterior caracterizado porque como dicho factor (iii) inductor de la síntesis de quitinasas se utiliza quitosano.
14. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación anterior caracterizado porque como dicho factor inductor de síntesis de quitinasas (iii) se utiliza quitosano a una concentración entre 1 y 20 g por 100 g de bentonita.
15. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación anterior caracterizado porque como dicho factor inductor de síntesis de quitinasas (iii) se utiliza quitosano a una concentración de 5 g por 100 gramos de bentonita.



16. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 caracterizado porque sus componentes una vez mezclados, se incuban a temperaturas entre 20-30°C por un tiempo entre 1 y 10 días.
- 5 17. Producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según reivindicación anterior caracterizado porque dicha incubación se realiza a una temperatura entre 25-28 °C durante 5 días.
- 10 18. Procedimiento para la obtención de un producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular de melón según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 caracterizado porque comprende la preparación de un soporte sólido como bentonita que contiene 5 g de CO<sub>3</sub>Ca y 5g de quitosano/ 100 g de bentonita, mezclado y homogeneizado en seco, inoculado con 1 ml de un cultivo biológicamente puro de *T. harzianum* T-78 CECT 20714 a una
- 15 concentración en torno a 10<sup>9</sup> ufc/ml, todo ello mezclado y preincubado durante 5 días a 25-28 °C.
- 20 19. Método de aplicación de un producto sólido eficaz para el control biológico de la fusariosis vascular según reivindicación 18, caracterizado porque se mezcla con la turba al 10% mediante el uso de una mezcladora estándar de las utilizadas en los semilleros comerciales.
- 25 20. Procedimiento para inducir resistencia sistémica a enfermedades causadas por organismos fitopatógenos que comprende aplicar una cantidad eficaz del producto obtenido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o por el procedimiento según reivindicación 18 sobre el suelo o la planta a la que se desea inducir resistencia sistémica a enfermedades.
- 30 21. Procedimiento para estimular el crecimiento de plantas que comprende aplicar una cantidad eficaz del producto obtenido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o por el procedimiento según reivindicación 18 sobre suelo o planta cuyo crecimiento se desea estimular.
22. Utilización de un producto sólido eficaz para el control de la fusariosis vascular de melón según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o por

el procedimiento según reivindicación 18 para el control biológico de esta enfermedad en semillero.

23. Utilización de un producto sólido eficaz para el control de la fusariosis vascular de melón según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o por  
5 el procedimiento según reivindicación 18 para el control biológico de la fusariosis vascular en campo de cultivo.

24. Uso de *Trichoderma harzianum*, cepa T-78, CECT 20714. para el control biológico de la fusariosis vascular.

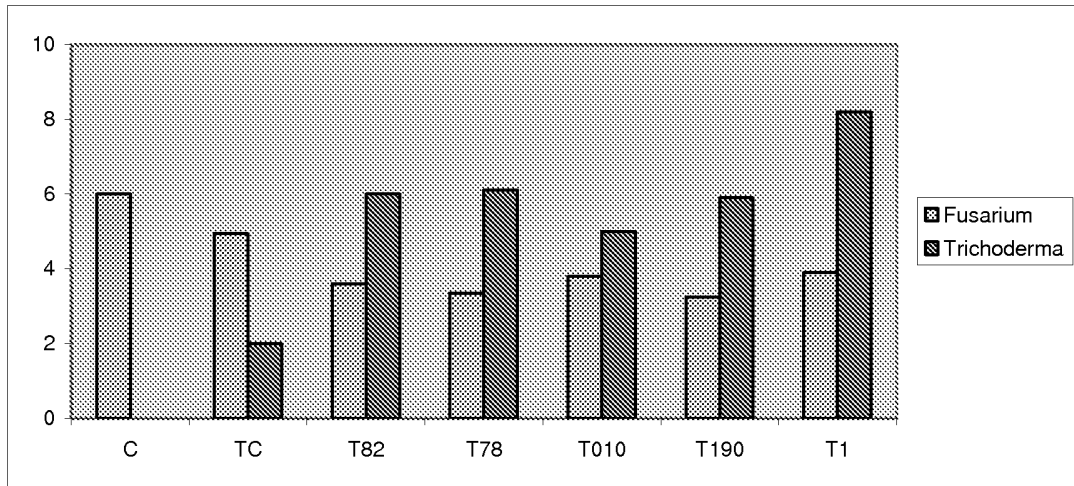
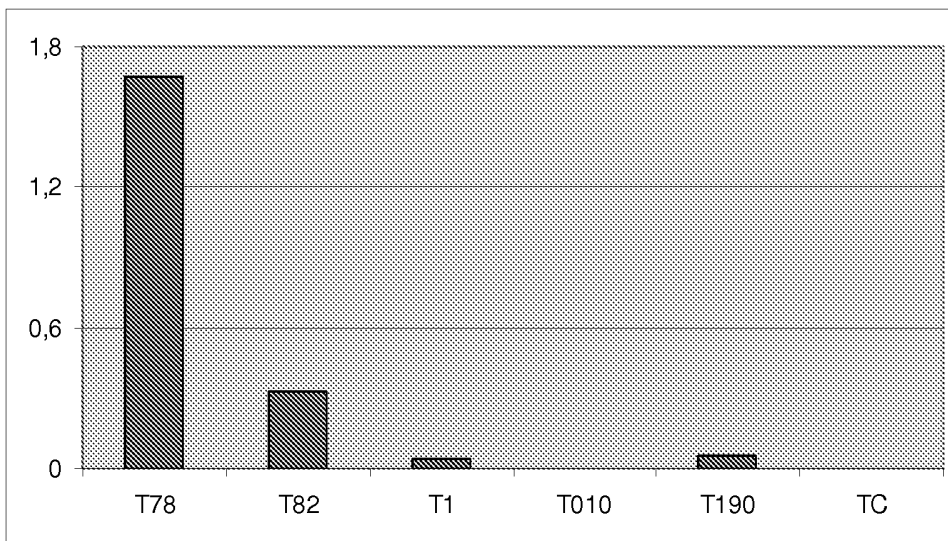


FIGURA 1

2/7

(A)



(B)

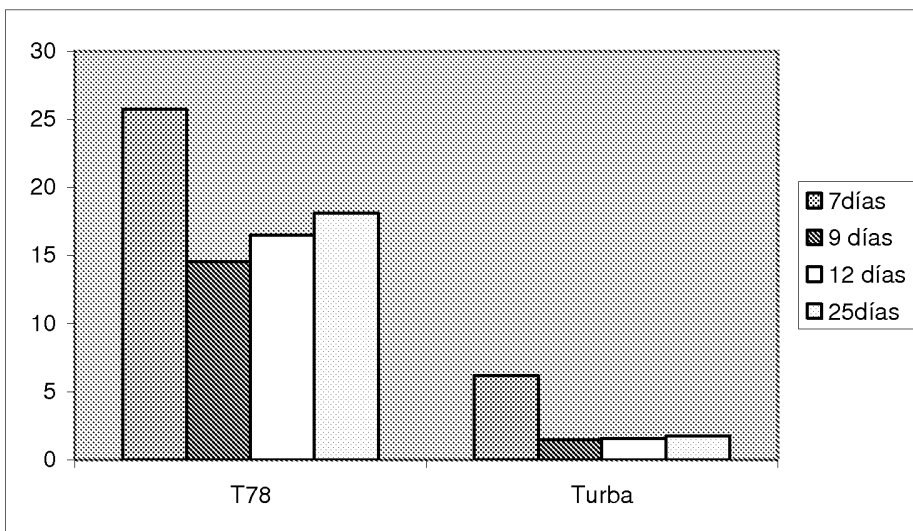


FIGURA 2

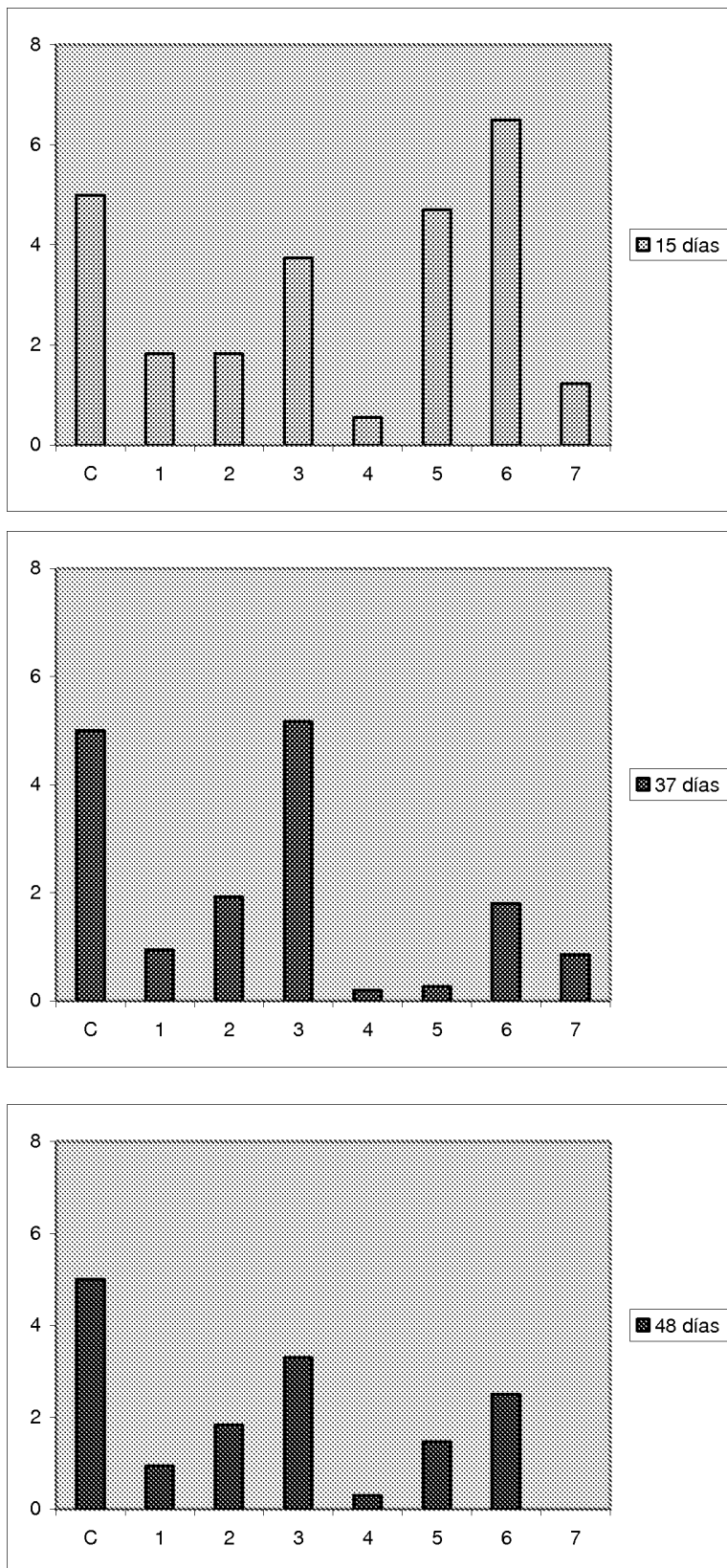


FIGURA 3

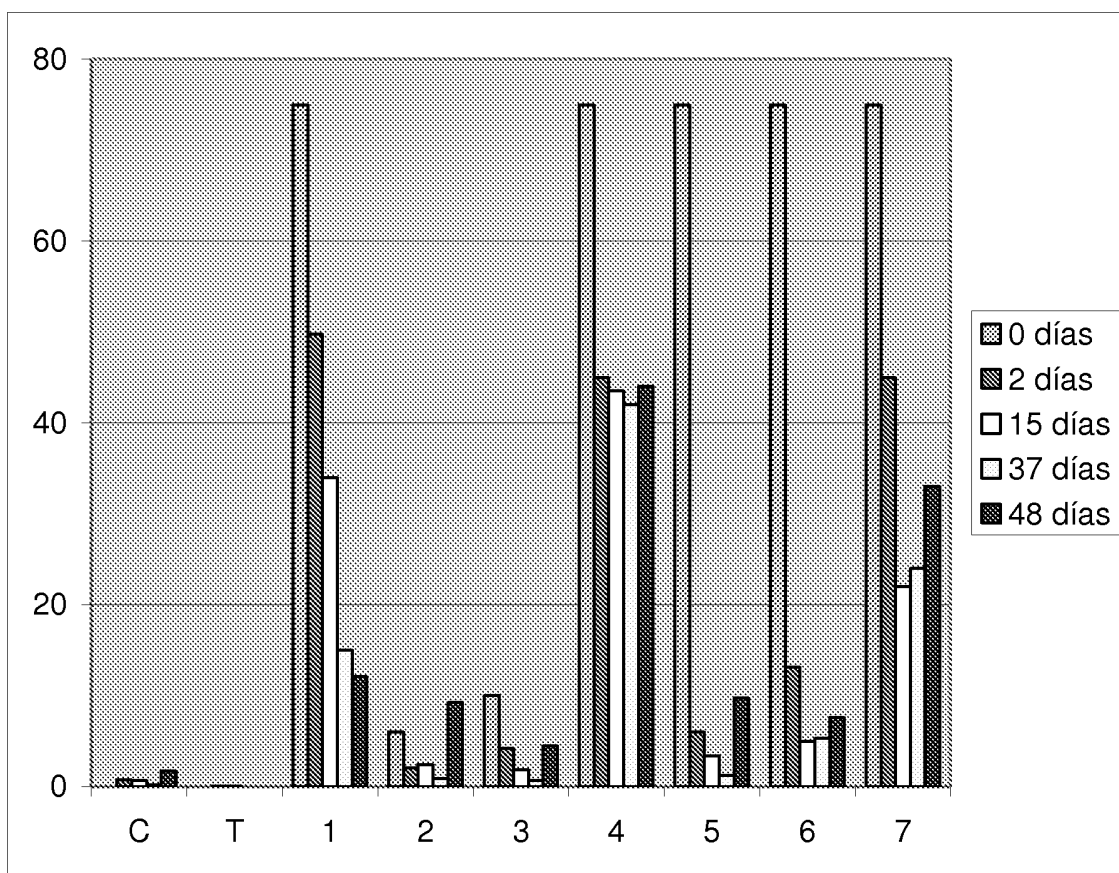
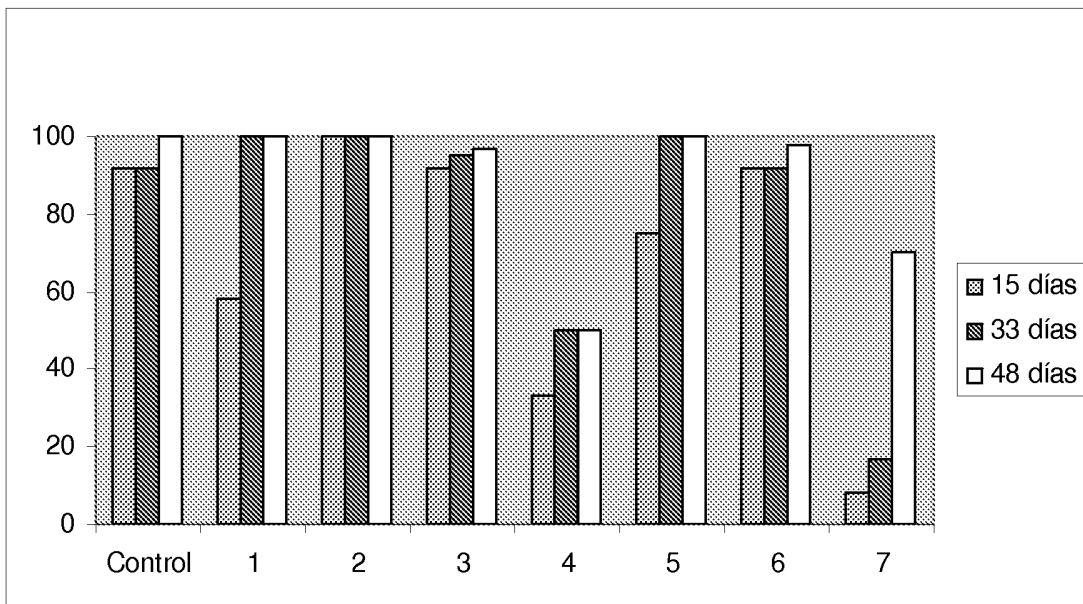


FIGURA 4

5/7

(A)



(B)

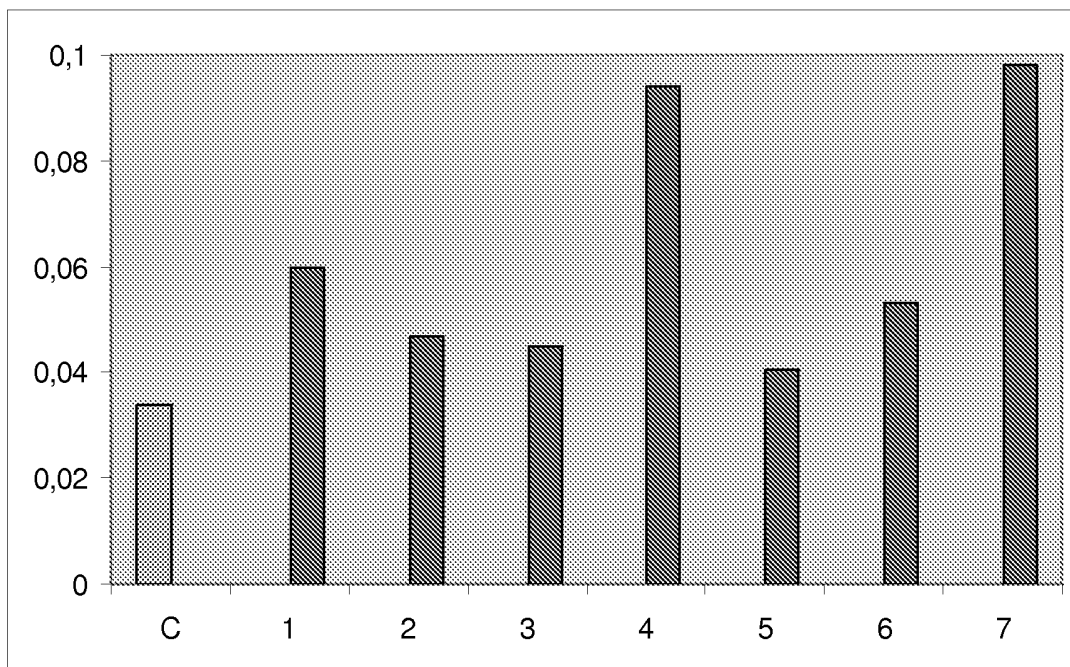
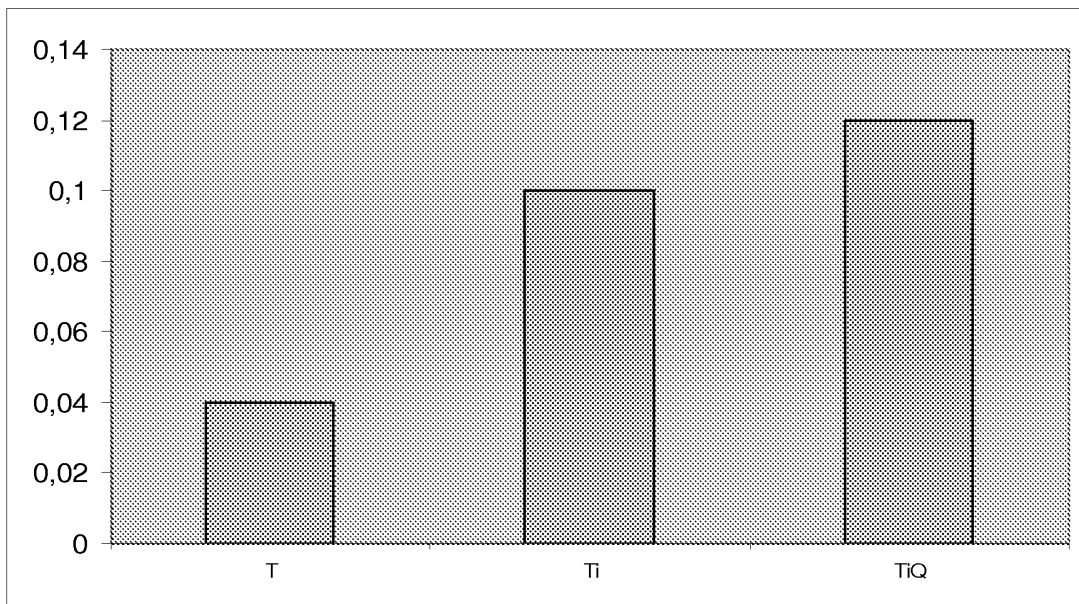


FIGURA 5

6/7

(A)



(B)

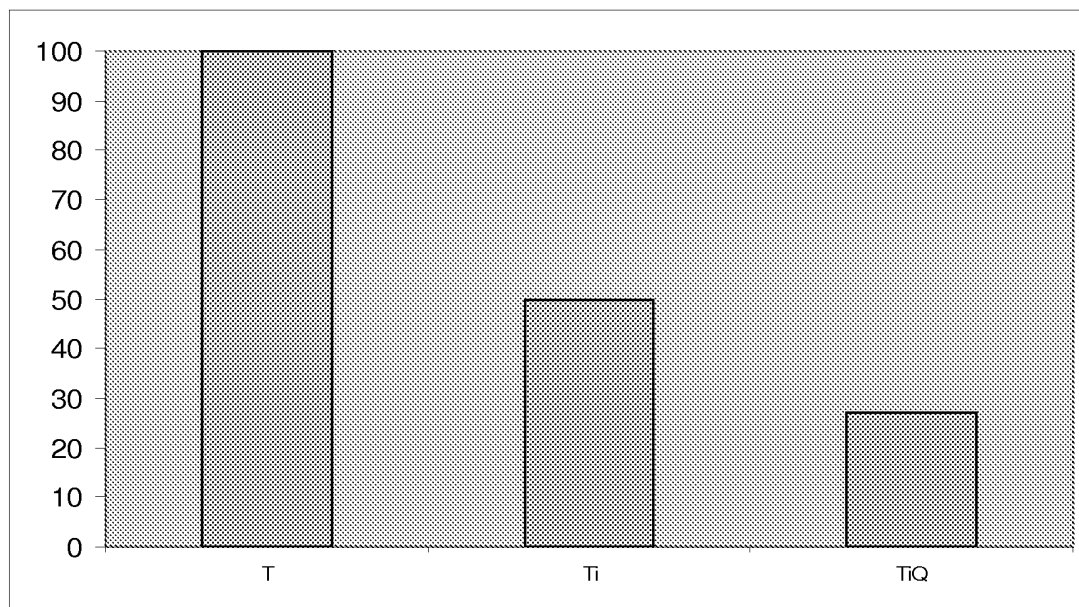
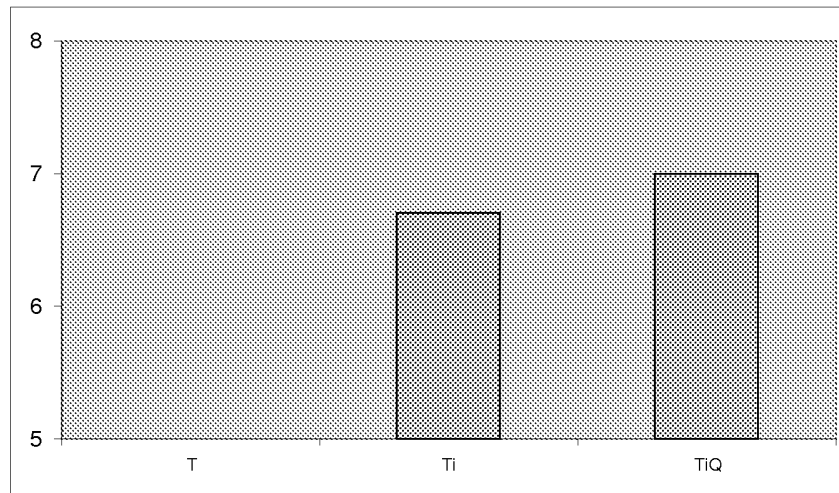


FIGURA 6

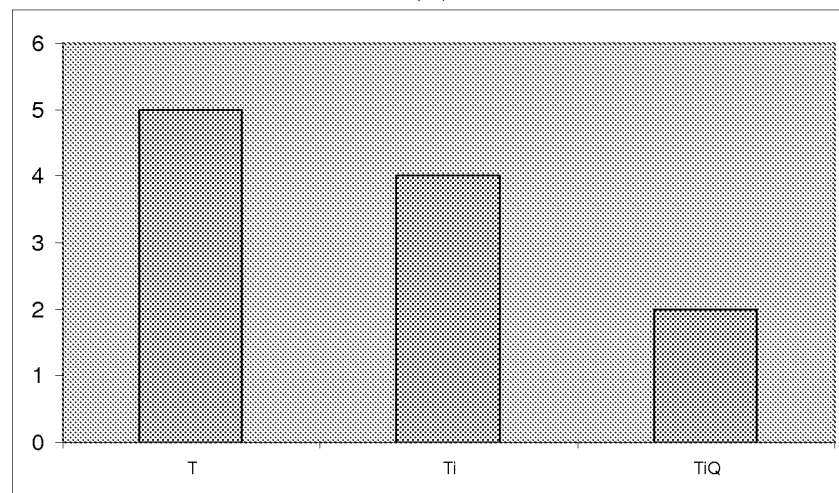


7/7

(A)



(B)



(C)

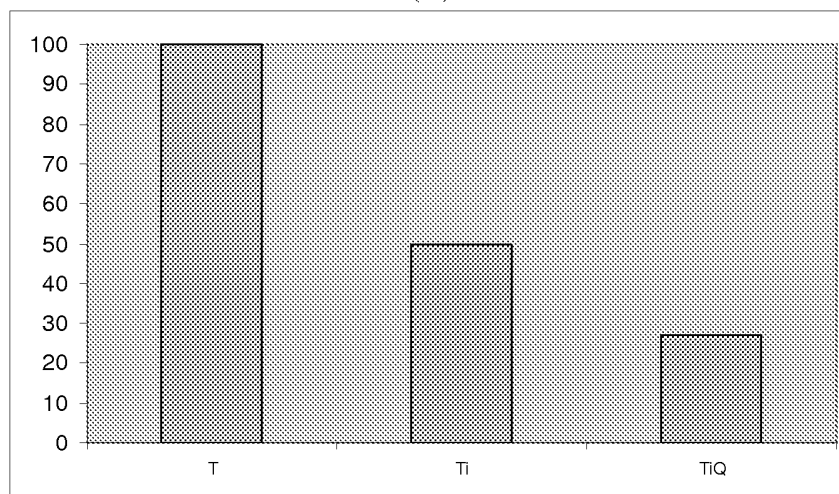


FIGURA 7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2007/070198

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, HCAPLUS, INTERNET

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Bernal, A. et al. Tratamiento biológico de la fusariosis del melón con compost inoculado. Agricultura, Revista Agropecuaria, 2005, vol. 74 (n° 872), pages 188-191.	1-4,12, 20-24
Y		5-11,13-17
Y	WO 2006/070061 A1 (VERDERA OY) 06.07.2006, claims 1-3, 5,7; page 5, lines 1-20; example 1.	5-11,13-17
X	US 4748021 A (CHET et al.) 31.05.1988, column 3, lines 61-column 4, line 34, examples.	1-6,16,17, 20-24
X	Ashrafizadeh, A. et al. Evaluation of Trichoderma isolates for biocontrol of Fusarium wilt melon. Iran. J. Path, 2005, vol. 41, abstract.	1-4,6,20-24
A	EP 470287 A1 (SHOWA DENKO KABUSHIKI) 12.02.1992	

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 March 2008 (25.03.2008)

Date of mailing of the international search report

(02/04/2008)

Name and mailing address of the ISA/

O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

A. Polo Díez

Telephone No. +34 91 349 55 24

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2007/070198

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91/07869 A1 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION) 13.06.1991	
A	EP 485229 A1 (SHELL INTERNATIONAL RESEARCH MAATSCHAPPIJ) 13.05.92	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2007/070198

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4748021 A	31.05.1988	EP 0133878 AB EP 19840106349 IL 69368 A DE 3481577 D	13.03.1985 04.06.1984 19.03.1990 19.04.1990 19.04.1990
WO 2006070061 A	06.07.2006	FI 20041704 A CA 2589857 A EP 20050823319	01.07.2006 06.07.2006 30.12.2005 30.12.2005
EP 0470287 A	12.02.1992	JP 2212406 A JP 2714681 B	23.08.1990 16.02.1998 16.02.1998
WO 9107869 A	13.06.1991	NONE	-----
EP 0485229 AB	13.05.1992	EP 19910310347 AT 117282 T DE 69106842 D ES 2067165 T DK 485229 T DE 69106842 T	08.11.1991 15.02.1995 02.03.1995 16.03.1995 20.03.1995 18.05.1995

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2007/070198

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A01N 63/00* (2006.01)

*A01N 63/04* (2006.01)

*A01N 25/08* (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES 2007/070198

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, HCAPLUS, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	Bernal, A. et al. Tratamiento biológico de la fusariosis del melón con compost inoculado. Agricultura, Revista Agropecuaria, 2005, vol. 74 (nº 872), páginas 188-191.	1-4,12, 20- 24
Y		5-11,13-17
Y	WO 2006/070061 A1 (VERDERA OY) 06.07.2006, reivindicaciones 1-3, 5,7; página 5, líneas 1-20; ejemplo 1.	5-11,13-17
X	US 4748021 A (CHET et al.) 31.05.1988, columna 3, líneas 61-columna 4, línea 34, ejemplos.	1-6,16,17, 20-24
X	Ashrafizadeh, A. et al. Evaluation of Trichoderma isolates for biocontrol of Fusarium wilt melon. Iran. J. Path, 2005, vol. 41, resumen.	1-4,6,20-24
A	EP 470287 A1 (SHOWA DENKO KABUSHIKI) 12.02.1992	

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

25 Marzo 2008 (25.03.2008)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

02 de abril de 2008 (02/04/2008)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

A. Polo Díez

Nº de teléfono +34 91 349 55 24

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°  
PCT/ES 2007/070198

C (continuación).		
DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	WO 91/07869 A1 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION) 13.06.1991	
A	EP 485229 A1 (SHELL INTERNATIONAL RESEARCH MAATSCHAPPIJ) 13.05.92	

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2007/070198

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 4748021 A	31.05.1988	EP 0133878 AB EP 19840106349 IL 69368 A DE 3481577 D	13.03.1985 04.06.1984 19.03.1990 19.04.1990 19.04.1990
WO 2006070061 A	06.07.2006	FI 20041704 A CA 2589857 A EP 20050823319	01.07.2006 06.07.2006 30.12.2005 30.12.2005
EP 0470287 A	12.02.1992	JP 2212406 A JP 2714681 B	23.08.1990 16.02.1998 16.02.1998
WO 9107869 A	13.06.1991	NINGUNO	-----
EP 0485229 AB	13.05.1992	EP 19910310347 AT 117282 T DE 69106842 D ES 2067165 T DK 485229 T DE 69106842 T	08.11.1991 15.02.1995 02.03.1995 16.03.1995 20.03.1995 18.05.1995



**CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD**

*A01N 63/00* (2006.01)

*A01N 63/04* (2006.01)

*A01N 25/08* (2006.01)