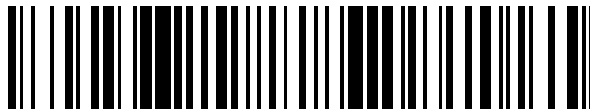


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 099**

21 Número de solicitud: 201731151

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

A01N 63/00 (2010.01)

C05F 11/08 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

27.09.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.03.2019

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

21.11.2019

Fecha de concesión:

27.01.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

03.02.2020

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA (66.7%)
Ctra. de Sacramento s/n
04120 Almería (Almería) ES y
CENTRO DE INVESTIGACIÓN,
EXPERIMENTACIÓN Y SERVICIOS DEL
CHAMPIÑÓN (33.3%)

72 Inventor/es:

DIÁNEZ MARTÍNEZ, Fernando ;
SANTOS HERNÁNDEZ, Milagrosa y
GEA ALEGRÍA, Francisco José

54 Título: **Nueva cepa de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum*, composiciones y aplicaciones de la misma**

57 Resumen:

Nueva Cepa de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum*, composiciones y aplicaciones de la misma.

La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum*, con número de depósito CECT nº 20974 y que se ha denominado Tae52481.

Dadas las propiedades de esta nueva cepa, en la presente invención se contempla su uso para potenciar el crecimiento de plantas, tales como cultivos hortícolas u ornamentales. Asimismo, se refiere a una composición que comprende dicha cepa, con capacidad de promover el desarrollo de plantas en suelos salinos, con presencia de patógenos o condiciones de estrés. Por ello, se describe su uso como biofertilizante para plantas.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 706 099 B2

DESCRIPCIÓN

Nueva cepa de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum*, composiciones y aplicaciones de la misma.

5

Sector de la técnica

Esta invención se encuadra en el sector técnico de la microbiología agrícola, más concretamente en el relativo a la aplicación de microorganismos en los cultivos agrícolas para la biofertilización y promoción del crecimiento vegetal.

10

Antecedentes de la invención

El uso de microorganismos en agricultura ha experimentado un desarrollo notable en los últimos años. Su uso va orientado principalmente para dos fines: actuar como agente de control biológico de plagas o enfermedades de los cultivos y/o ejercer un efecto promotor del crecimiento vegetal.

15

Existen numerosos microorganismos beneficiosos, y su uso en los sistemas agrícolas puede mejorar la nutrición, la resistencia a estreses abióticos y bióticos, y proporciona una transición efectiva desde sistemas de producción basados en el uso de productos químicos a otros más sostenibles. La búsqueda de nuevas herramientas que permitan reducir el uso de plaguicidas y fertilizantes químicos, es un objetivo que hay que alcanzar a medio plazo.

20

Los microorganismos más efectivos como promotores del crecimiento vegetal son las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria), hongos micorrícicos, y los hongos promotores del crecimiento vegetal (PGPF, Plant Growth Promoting Fungi). Los microorganismos con efectos benéficos sobre las plantas tienen un potencial considerable como biofertilizantes y como agentes de control biológico. Actualmente, en la agricultura se aplican tratamientos con biopreparados a diversos cultivos, sobre todo en la fase de siembra y trasplante, ya que surge la necesidad de proteger la plántula en este momento de estrés, haciéndola fuerte y vigorosa. Los microorganismos también pueden ser usados como bioactivadores o bioestimuladores, que se definen como “productos que contienen células vivas o latentes de cepas microbianas, previamente seleccionadas, que se caracterizan por producir sustancias fisiológicamente activas (auxinas, giberelinas, citoquininas, aminoácidos, péptidos y vitaminas) que al interactuar con la planta desencadenan diferentes eventos metabólicos como estimular el crecimiento, desarrollo y rendimiento de cultivos” (Dibut, 2006).

25

30

35

Los bioestimulantes de las plantas se formulan con diversos microorganismos y/o sustancias que se aplican a diferentes cultivos con el objetivo de mejorar el crecimiento, el desarrollo y la adaptación al estrés abiótico. Los productos formulados en base al género *Trichoderma* han sido muy exitosos debido a su gran capacidad para controlar los hongos fitopatógenos, debido a su carácter micopatógeno y asimismo, de promover el desarrollo de plantas. Algunas cepas de *Trichoderma* tienen una acción biostimulante predominante que las hace únicas para distintos cultivos. Son seguros para los seres humanos, el ganado y las plantas de cultivo y en su estado natural.

40

45

Colonizan las raíces de las plantas sin reacciones adversas aparentes. Tanto formulaciones sólidas como líquidas que contienen conidios pueden ser utilizados para producir cantidades adecuadas de inóculos activos y viables desde que se produce el formulado hasta que se utiliza en campo. El mecanismo de la fitoestimulación por *Trichoderma* involucra a múltiples niveles: comunicación con los sistemas de raíces y brotes, ya que libera en la rizosfera auxinas, pequeños péptidos, volátiles y otros metabolitos activos, que promueven la

50

ramificación de las raíces y la absorción de nutrientes, aumentando así el crecimiento y el rendimiento de las plantas.

5 Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, los cuales son capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Las especies de *Trichoderma* se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos. Sin embargo, las enfermedades más graves en el cultivo de hongos son las llamadas mohos verdes causadas por hongos del género *Trichoderma*, dando lugar a enormes pérdidas de rendimiento en las plantaciones de setas, debido a su carácter micopatógeno. En Europa, la forma más agresiva es *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*. Esta variedad es un biotipo no-agresivo de *T. harzianum* pero difiere considerablemente de ella, principalmente por la velocidad de crecimiento del micelio. Sin embargo, esta especie no afecta a otra especie que no sea hongos, por lo que puede ser utilizada como agente promotor de plantas, además de como controlador de hongos fitopatógenos.

20 La necesidad de encontrar mecanismos que eleven la productividad del campo ha impulsado la búsqueda de estrategias de control de enfermedades agrícolas que sean alternativas eficientes al control químico y que además implique bajar el riesgo ambiental y sanitario sin arriesgar la salud humana, constituye hoy en día un gran reto para la agricultura y su desarrollo.

25 **Objeto de la invención**

Es objeto de la invención una nueva cepa de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* con número de depósito CECT nº 20974.

30 Asimismo, es objeto de la invención el empleo de la cepa, y de la composición que la comprende, para la biofertilización, para potenciar el crecimiento y/o producción de plantas, por ejemplo, cultivos hortícolas, plantas ornamentales e incluso forestales.

35 Son objeto de la presente invención todas las realizaciones que se mencionan en las reivindicaciones dependientes en esta memoria.

40 “Biofertilizante” y “bioestimulante” tienen el mismo significado, como sustancias que estimulan el crecimiento de las plantas.

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa promotora del crecimiento vegetal, denominada Tae52481, de la especie *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum*, que fue depositada el 23 de mayo de 2017, en la Colección Española de Cultivos Tipo, con CECT nº 20974, (Universidad de Valencia, 56100 Burjassot, Valencia, España) según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Fines del Procedimiento de Patente.

50 Dicha cepa constituye un eficaz microorganismo bioestimulante y promotor del crecimiento de las plantas, tales como cultivos. Este hongo promotor, cultivado en forma biológicamente pura, se denomina Tae52481 y se ha identificado mediante la secuenciación de la región ITS (Internal Transcriber Spacer) del ADNr utilizando los cebadores ITS-1 e ITS-4.

La secuencia obtenida con el cebador ITS1, que es un fragmento de ADN del gen ribosomal de Tae52481 es una secuencia no codificante, y que está identificada como SEQ ID NO 1: en la lista de secuencias que acompaña a esta memoria.

5 La cepa Tae52481 de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* se aisló de sustratos con *Agaricus bisporus* (champiñón) con síntomas de la enfermedad conocida como moho verde causado por *T. aggressivum* fsp *europaeum* procedentes de la comarca de la Manchuela (Cuenca). La velocidad de crecimiento de *T. aggressivum* fsp *europaeum* en medio de cultivo agarizado (agar-malta) y en estufa a 25°C ha sido de:

10

- Día 1: 1cm

- Día 2: 2,7 cm

15 - Día 3: 4,4 cm

- Día 4: 6,1 cm

- Día 5: 7,7 cm

20

- Día 6: toda la placa (placa de Petri de 9 cm de diámetro).

La cepa Tae52481 de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* ha sido ensayada en condiciones de semillero y de campo. Los ensayos se han realizado en condiciones de uso comercial en el que, a modo de ejemplo, se puede indicar que en ningún caso en los que se ha ensayado se ha realizado una desinfección o esterilización de los sustratos o suelos en los que se ha realizado la inoculación, práctica que, en general es recomendada para muchos productos de este tipo, lo que supone una ventaja respecto a los productos biofertilizantes existentes.

30

Dadas las propiedades de esta nueva cepa, en la presente invención se contempla su uso para potenciar el crecimiento de plantas, por ejemplo, cultivos hortícolas, plantas ornamentales o forestales.

35 La presente invención se refiere también a una composición biofertilizante que comprende un cultivo biológicamente puro de la cepa Tae52481.

Según realizaciones particulares la presente invención se refiere también a una composición biofertilizante que comprende al menos:

40

- un cultivo biológicamente puro de la cepa Tae52481 y

- un vehículo.

45 Del concepto "cultivo biológicamente puro de la cepa Tae52481" se debe entender que el cultivo puede contener metabolitos derivados de la propia cepa.

En esta memoria "cultivo biológicamente puro de la cepa Tae52481", "la cepa Tae52481", "esporas de la cepa Tae52481" o "Tae52481" se usan indistintamente.

50

La composición de la invención puede estar en forma sólida, líquida, gelificada o coloidal.

La composición de la invención puede comprender además uno o más microorganismos distintos de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum*, por ejemplo, otra especie de *Trichoderma*.

5 El vehículo tiene la función de ser un agente adecuado y necesario para la dispersión de la cepa, multiplicación, o ambas, o también para la conservación de las esporas sin que germinen, por ejemplo, cuando el vehículo es una solución salina.

10 El vehículo puede ser uno o más productos que se mezclan con el cultivo de la cepa Tae52481 como medio para obtener una composición que se pueda manipular, y que a la vez favorece la dispersión y/o multiplicación de la cepa.

Un vehículo en las composiciones de la presente invención, está seleccionado entre:

15 a) - sustrato

b) - agua de riego,

20 c) - solución salina

d) - mezclas de al menos dos de a) b) y c).

25 El vehículo puede ser sólido, líquido, coloidal o gelificado, por ejemplo, está gelificado en el caso de que se añada alginato. Así, en una realización particular de la composición de la invención, el vehículo se selecciona entre un medio sólido, líquido, coloidal o gelificado, donde van a ir incorporadas las esporas del hongo.

30 En el contexto de la presente invención, un sustrato es una sustancia o una mezcla de sustancias que se pueden utilizar para el crecimiento de plantas. Dicho sustrato puede ser, por ejemplo, cualquiera de los empleados habitualmente en horticultura.

35 Un sustrato generalmente comprende uno o más tipos de agregados ligeros neutros (perlita, vermiculita entre otros) y un constituyente orgánico (turba de *Sphagnum*, compost, entre otros), opcionalmente con suelo. En la formulación de sustratos las proporciones utilizadas de los ingredientes antes mencionados pueden variar, según el sustrato elegido, el tamaño de maceta, tipo de planta a producir, sistema de riego, entre otros factores, y por lo tanto, la cantidad hay que adaptarla para cada caso.

40 El sustrato puede ser por ejemplo turba, fibra de coco, compost y mezclas de los mismos. En realizaciones particulares los sustratos son compost, preferiblemente los obtenidos de orujo de vid, champiñón, residuos hortícolas, residuos sólidos urbanos, residuos de jardinería, vermicompost y mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas de la composición de la invención, se emplean sustratos formulados a base de turba o de compost del tipo TCP (Turba+compost+perlita), compost-turba-vermiculita, compost-turba-fibra de coco, o cualquier
45 mezcla de los mismos.

Las composiciones sólidas pueden estar en forma de polvo, gránulos o polvos humectables, mientras que las composiciones líquidas pueden estar en forma de medios acuosos o no acuosos, en suspensiones, dispersiones o de forma concentrada.

50 Asimismo, la cepa Tae52481 de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* puede incluirse en matrices de biopolímeros (sin excluir otras posibles formulaciones) tales como alginato de calcio, agar, y los posibles aditivos que se consideren para cada situación a la que se destine el producto.

El microorganismo, es decir, la cepa Tae52481, se puede mezclar a modo de ejemplo, con solución salina, o se puede encapsular, o bien, se puede mezclar un sustrato, tal como turba, con las esporas de Tae52481.

5 Según realizaciones particulares la composición de la invención comprende un cultivo de Tae52481 mezclado con un sustrato, tal como turba, que actúa como vehículo, para su aplicación.

10 En el caso de mezclar el cultivo de la cepa con el sustrato, se puede también opcionalmente obtener una composición en la que el cultivo de la cepa está mezclado con solución salina, y esta mezcla en forma líquida, se agrega a un sustrato que actúa también - además de la solución salina - como vehículo.

15 La presente invención se refiere también a una combinación que comprende al menos:

- un cultivo biológicamente puro de la cepa Tae52481 y

- un agente seleccionado entre:

20 - una planta.

- una semilla.

25 En el caso de la combinación de la invención, el agente, - la propia planta a la que se pretende bioestimular o una semilla de una planta - es el objeto sobre el que se pretende que la cepa Tae52481 produzca sus efectos.

La combinación según realizaciones particulares comprende:

30 - un cultivo biológicamente puro de la cepa Tae52481

- una planta.

35 La combinación según realizaciones particulares comprende:

- un cultivo biológicamente puro de la cepa Tae52481

- una semilla y

40 - un vehículo.

Un vehículo, que tiene las mismas funciones mencionadas anteriormente para las composiciones, en las combinaciones que comprenden semillas, según la presente invención está seleccionado entre:

45 a) - un sustrato

b) - agua de riego,

50 c) - solución salina

d) - mezclas de al menos dos de a), b) y c).

El sustrato en las combinaciones definidas puede ser cualquiera de los definidos anteriormente para las composiciones de la invención.

5 En el caso de que el agente sea una semilla, la cepa se puede mezclar con la semilla mediante el uso de una sustancia como alginato, de modo que las semillas quedan impregnadas de la cepa.

10 Es decir, la cepa puede incorporarse a la semilla, al sustrato donde se va a sembrar o simplemente añadirla en agua de riego.

15 La composición de la invención puede estar por lo tanto formando parte de una semilla, con lo que se obtiene una combinación como las que se han definido anteriormente. En este caso, las propias semillas actúan también como vehículo para dispersión y/o multiplicación de la cepa. Opcionalmente se puede preparar una combinación que contenga el microorganismo impregnado sobre semillas, y a su vez formando parte de un sustrato.

En las combinaciones definidas anteriormente, se pueden impregnar semillas con la suspensión de esporas, o mezclar un sustrato, tal como turba, con las esporas de Tae52481.

20 Tanto en las composiciones bioestimulantes como en las combinaciones definidas, la cepa Tae52481 está presente en forma de conidias. La concentración de conidias que es añadida a la composición o combinación puede estar comprendida entre $1 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^{12}$ conidias/mL de agua.

25 Tanto las composiciones bioestimulantes como las combinaciones definidas anteriormente pueden incluir adyuvantes, tales como emulsionantes, agentes de suspensión, agentes de pegajosidad, etc., así como otro u otros agentes de estimulación del crecimiento y control biológico.

30 La obtención de la composición biofertilizante de la invención o las combinaciones definidas, se puede llevar a cabo mediante la inoculación de la cepa Tae52481 en el vehículo correspondiente, bien incorporada a un sustrato comercial como turba, o resuspendiendo las esporas a la dosis comercial en el vehículo que se desee ya sea líquido o sólido y que permita su supervivencia.

35 La composición de la invención es eficaz para potenciar el crecimiento y/o producción de plantas. Las plantas que pueden ser susceptibles de promoción del crecimiento comprenden plantas hortícolas, ornamentales e incluso forestales.

40 Sin establecer ninguna limitación, los efectos provocados por *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 afectan al crecimiento de la planta, que puede ser en forma de incrementar la masa de la raíz, profundidad radicular, calibre del tallo o longitud de planta.

45 *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 se puede aplicar en cualquier medio y ambiente sin limitación (al suelo, a un sustrato, a un cultivo hidropónico simplemente adicionándolo al agua) siempre y cuando se encuentre en las condiciones adecuadas (es decir, las condiciones normales de un cultivo).

50 En otro aspecto principal la invención se refiere al uso de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481, al uso de la composición descrita, o al uso de las combinaciones descritas, para potenciar el crecimiento y/o producción de cultivos hortofrutícolas u otras plantas en suelos con problemas fitosanitarios o estrés.

En otro aspecto principal la invención se refiere al uso de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 con fungicidas compatibles. Para facilitar las tareas para el agricultor, en un mismo riego se puede utilizar otros microorganismos o fungicidas compatibles, en una sola aplicación.

5 Los métodos de aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 se realizan principalmente por medio de conidias. Sin establecer limitaciones, normalmente la composición comprende uno o varios coadyuvantes y el microorganismo en cuestión.

10 La concentración de conidias que es añadida a la composición o combinación puede estar comprendida entre $1 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^{12}$ conidias/mL de agua. Dicho microorganismo se ha producido en un medio de cultivo de base sólida suplementada con los elementos nutricionales requeridos para cada caso.

15 La presente invención también se refiere a un método para estimular el crecimiento de las plantas que comprende obtener una composición como la que se ha definido anteriormente y poner en contacto las plantas o semillas de dichas plantas con la composición.

20 Los ejemplos que siguen a continuación ilustran la presente invención, pero no deben ser considerados como limitaciones a los aspectos esenciales del objeto de la misma, tal como han sido expuestos en los apartados anteriores de esta descripción.

Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1. Efecto de la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 en diferentes parámetros morfológicos de plántulas de tomate en sistema de cultivo bigplant. En cada parámetro se indica la unidad, por lo que el eje “y” solo son números que se corresponden con los tratamientos realizados (eje x).

30 Figura 2. Efecto de la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 en diferentes parámetros morfológicos de plántulas de melón en sistema de cultivo bigplant.

Figura 3. Efecto de la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 en un cultivo de brócoli en suelo.

35 Figura 4. Efecto de la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* plántulas brócoli en maceta.

40 Figura 5. Efecto de la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 a tres dosis diferentes (TAE D1, TAED2 Y TAED3: 104, 105, 106 esporas/mL, respectivamente) en el peso fresco total aéreo de plántulas de tomate. T0: testigo.

45 Figura 6. Efecto de la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 a tres dosis diferentes (TAE D1, TAED2 Y TAED3: 104, 105, 106 esporas/mL, respectivamente) en el peso seco de la raíz de plántulas de tomate. T0: testigo.

Figura 7. Efecto de la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 a tres dosis diferentes (TAE D1, TAED2 Y TAED3: 104, 105, 106 esporas/mL, respectivamente) en el número de hojas de plántulas de tomate. T0: testigo.

50 Figura 8. Efecto de la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 mediante riego en la Incidencia de podredumbre gris en pimiento.

Figura 9. Efecto de la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 en el desarrollo de plántulas de papaya.

Realización preferente de la invención

5

Ejemplo 1

Una cepa de género *Trichoderma*, *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481, se aisló de compost, utilizado éste como sustrato en cultivo de *Agaricus bisporus*, con sintomatología de la enfermedad moho verde, en la comarca de La Manchuela, provincia de Cuenca como sigue:

Se realizó una siembra del compost en placa de Petri y se realizó una posterior identificación de las colonias formadas. La cepa pura resultante se denominó Tae52481 y se identificó mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) y posterior secuenciación de la región ITS (Internal Transcriber Spacer) del ADNr, perteneciendo a la especie *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum*.

Ejemplo 2

20

La cepa se creció en medio de cultivo agarizado PDA (Potato Dextrose Agar) en ambiente de laboratorio y se procedió a evaluar la cantidad de conidias producidas por Placa de Petri. A continuación, se procedió a la extracción de conidias y cuantificación en hematocímetro de su concentración. El producto final en agua estéril alcanzó una concentración entre 1·10⁶–10⁷ conidias/mL.

Los ensayos de viabilidad en medio salino mostraron viabilidad de conidias en el 100% de los casos, después de periodos de almacenamiento de 24 meses. Así como una adecuada conservación en dichos formulados, que se manifestaron en la ausencia de germinación en los mismos durante el periodo de almacenamiento.

Ejemplo 3

En la figura 1, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 en el desarrollo de plántulas de tomate en sistema de cultivo “big-plant” y el sustrato empleado fue turba. Se aplicó *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 a la dosis de 106 esporas/mL de agua. La aplicación se realizó mediante riego (R) al sustrato. Se añadieron 5 mL de la suspensión con las esporas por planta y/o maceta en una única aplicación. La duración del ensayo fue de 55 días, y posteriormente, se procedió a la toma de datos de los parámetros morfológicos. Los resultados revelan que se produce un incremento de los parámetros morfológicos evaluados tras la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481. Se observa un incremento en un 2,7%; 18,4%; 19%; 22,31% en el diámetro, peso seco de las hojas, peso seco del tallo y área foliar, respectivamente. Las letras a, y b, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Ejemplo 4

En la figura 2, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 en el desarrollo de plántulas de melón en sistema de cultivo “big-plant” y el sustrato empleado fue turba. Se aplicó *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 a la dosis de 106 esporas/mL de agua. La aplicación se realizó mediante riego (R) al sustrato. Se añadieron 5 mL de la suspensión con las esporas por planta y/o maceta en una única aplicación. La duración del ensayo fue de 55 días, y posteriormente, se

5 procedió a la toma de datos de los parámetros morfológicos. Los resultados revelan que se produce un incremento de los parámetros morfológicos evaluados tras la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481. Se observa un incremento en un 26,26%; 9,3%; 25,8%; 4,41% en la altura de la planta, peso seco del tallo y peso seco de la raíz y área foliar, respectivamente.

Las letras a, y b, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Ejemplo 5

10 Se realizaron ensayos de inoculación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 en un cultivo comercial de brócoli en invernadero. La inoculación se realizó mediante la aplicación en riego de una dosis de 106 esporas/mL de agua. La aplicación se realizó una sola vez en el momento del transplante añadiéndose 10 mL de la suspensión de conidias por planta.
15 La duración del ensayo fue de 60 días.

20 En la figura 3, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 en el desarrollo de brócoli. Como se puede comprobar se ha producido un incremento del 51,24; 7,6; 6 y 18,87 % en el peso seco de parte aérea, peso seco raíz, número de hojas y diámetro de la planta, respectivamente. Las letras a, y b, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Ejemplo 6

25 En la figura 4, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 en el desarrollo de plántulas de brócoli en macetas de un volumen de 300 mL y el sustrato empleado fue turba. Se aplicó *T. aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 a la dosis de 106 esporas/mL de agua. La aplicación se realizó mediante riego (R) al sustrato. Se añadieron 5 mL de la suspensión con las esporas por planta y/o
30 maceta en una única aplicación. La duración del ensayo fue de 30 días, y posteriormente, se procedió a la toma de datos de los parámetros morfológicos. Los resultados revelan que se produce un incremento de los parámetros morfológicos evaluados tras la aplicación de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481. Se observa un incremento en un 8,5; 25,20; 21,46; y 14,19 % en el número de hojas, altura, peso fresco y seco total,
35 respectivamente. Las letras a, y b, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Ejemplo 7

40 Tres dosis de conidias de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* Tae52481 (TaeD1: 104 esporas/mL, TaeD2: 105 esporas/mL de agua y TaeD3: 106 esporas/mL de agua) se aplicaron al desarrollo de plántulas de tomate. La aplicación se realizó mediante riego (R) al sustrato, añadiendo 1 mL de suspensión de esporas por planta en una sola aplicación. Los resultados
45 revelan que se produce un incremento en el peso fresco de la planta para las tres dosis aplicadas, existiendo diferencias significativas con respecto al testigo (Figura 5). El mayor incremento se observa para la dosis 2 (105 esporas/mL), suponiendo un incremento 20,96 % en el peso fresco con respecto al testigo (T0).

50 Asimismo, este mismo efecto se observa para los parámetros peso seco de raíz (Figura 6) y número de hojas (Figura 7). Las letras a, b y c, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Ejemplo 8

5 En la figura 8, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma aggressivum fsp europaeum* Tae52481 en el control del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* en plántulas de pimiento en macetas de un volumen de 300 mL y el sustrato empleado fue turba. Se aplicó *T. aggressivum fsp europaeum* Tae52481 a la dosis de 106 esporas/mL de agua. La aplicación se realizó mediante riego (R) al sustrato. No se realizó ningún tratamiento de control frente a la enfermedad vía aérea. Se añadieron 5 mL de la suspensión con las esporas por planta y/o maceta en una única aplicación. La duración del ensayo fue de 30 días, y posteriormente, se procedió a la toma de datos en cuanto a incidencia de enfermedad. Los resultados revelan que se produce una reducción de la enfermedad tras la aplicación de

10 *Trichoderma aggressivum fsp europaeum* Tae52481 en riego, y permite controlar la enfermedad, debido al buen desarrollo y vigor de la planta. Se observa una reducción de incidencia de la enfermedad de 51,44%.

Ejemplo 9

15 En la figura 9, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma aggressivum fsp europaeum* Tae52481 en el desarrollo de plántulas de papaya en bandejas de semillero y el sustrato empleado fue turba. Se aplicó *T. aggressivum fsp europaeum* Tae52481 a la dosis de 106 esporas/mL de agua. La aplicación se realizó mediante riego (R) al sustrato.

20 Se añadió 1 mL de la suspensión con las esporas por planta en una única aplicación. La duración del ensayo fue de 50 días, y posteriormente, se procedió a la toma de datos de algunos parámetros morfológicos antes de la siembra en suelo. Los resultados revelan que se produce un incremento del 35,76% en la altura de las plántulas de papaya tras la aplicación de *Trichoderma aggressivum fsp europaeum* Tae52481. Las letras a, y b, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. La cepa Tae52481 de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* que fue depositada el 23 de mayo de 2017, en la Colección Española de Cultivos Tipo con CECT nº 20974.
- 10 2. Procedimiento para obtener la cepa Tae52481 de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum* definida en la reivindicación 1, que comprende:
- aislar la cepa de una suelo que comprende dicha cepa, o de un medio de cultivo de la cepa e
 - identificarla mediante la secuenciación de la región ITS del ADNr utilizando los cebadores ITS-1 e ITS-4.
- 15 3. Composición biofertilizante que comprende un cultivo biológicamente puro de la cepa Tae52481.
- 20 4. Composición biofertilizante según la reivindicación 3, que comprende al menos:
- un cultivo biológicamente puro de la cepa Tae52481 y
 - un vehículo.
- 25 5. Composición según una de las reivindicaciones 3 ó 4, que está en forma sólida, líquida, gelificada o coloidal.
- 30 6. Una combinación que comprende al menos:
- un cultivo biológicamente puro de la cepa Tae52481 definida en la reivindicación 1 y
 - un agente seleccionado entre:
 - una planta
 - una semilla.
- 35 7. Una combinación según la reivindicación 6, que comprende al menos:
- un cultivo biológicamente puro de la cepa Tae52481 definida en la reivindicación 1 y
 - una planta.
- 40 8. Una combinación según la reivindicación 6, que comprende al menos:
- un cultivo biológicamente puro de la cepa Tae52481 definida en la reivindicación 1
 - una semilla y
 - un vehículo.
- 45 9. Composición según la reivindicación 4, o una combinación según la reivindicación 10, en la que el vehículo está seleccionado entre:
- a) – sustrato
- 50

b) – agua de riesgo,

c) – solución salina

5 d) – mezclas de al menos dos de a) b) y c).

10. Composición según una de las reivindicaciones 3 a 5, o una combinación según una de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además uno o más microorganismos distintos de *Trichoderma aggressivum* fsp *europaeum*.

10 11. composición según la reivindicación 4, o una combinación según la reivindicación 9, en la que el sustrato está seleccionado entre turba, fibra de coco, compost y combinaciones de los mismos.

15 12. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o una combinación según una de las reivindicaciones 6 a 8, donde la cepa Tae52481 está presente en forma de conidias.

20 13. Composición o combinación según la reivindicación 12 a la cual se han añadido conidias a una concentración comprendida entre $1 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^{12}$ conidias/mL de agua.

25 14. Composición según una de las reivindicaciones 3 a 5, o una combinación según una de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además al menos unos de las siguientes sustancias:

- un adyuvante

25 - un agente de estimulación del crecimiento

- un agente de control biológico o

30 - combinaciones de dos o más de los anteriores.

35

Figura 1

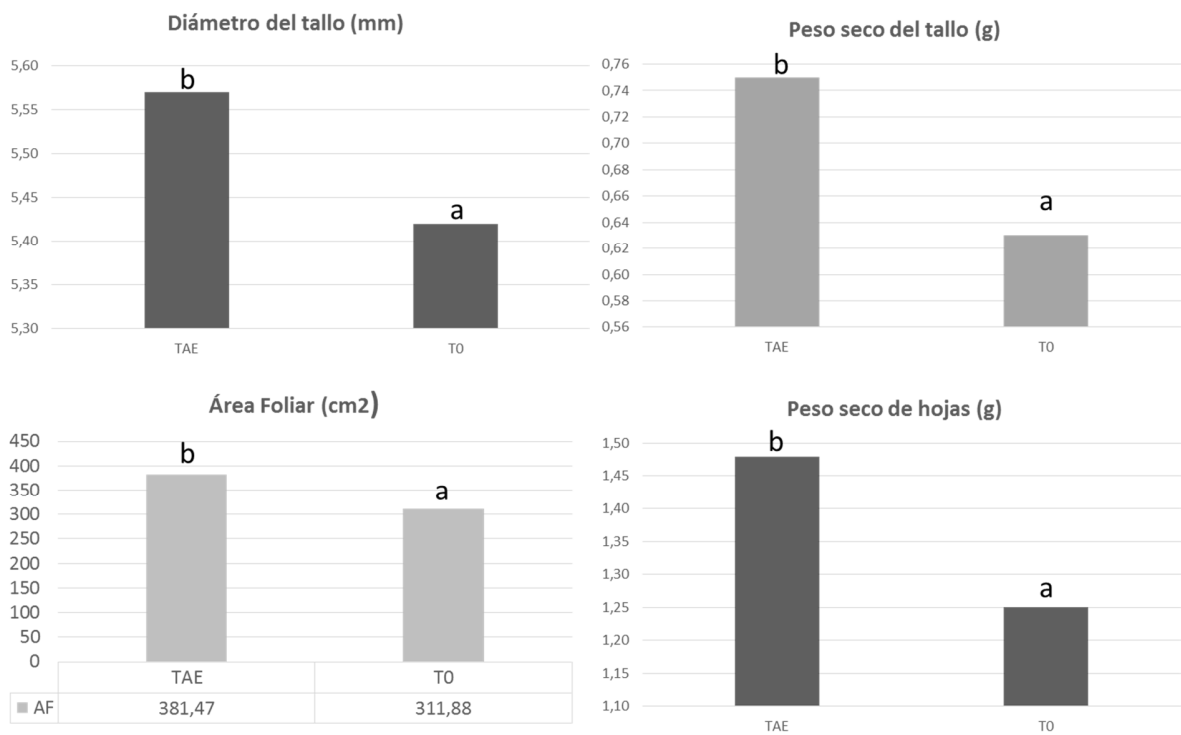


Figura 2

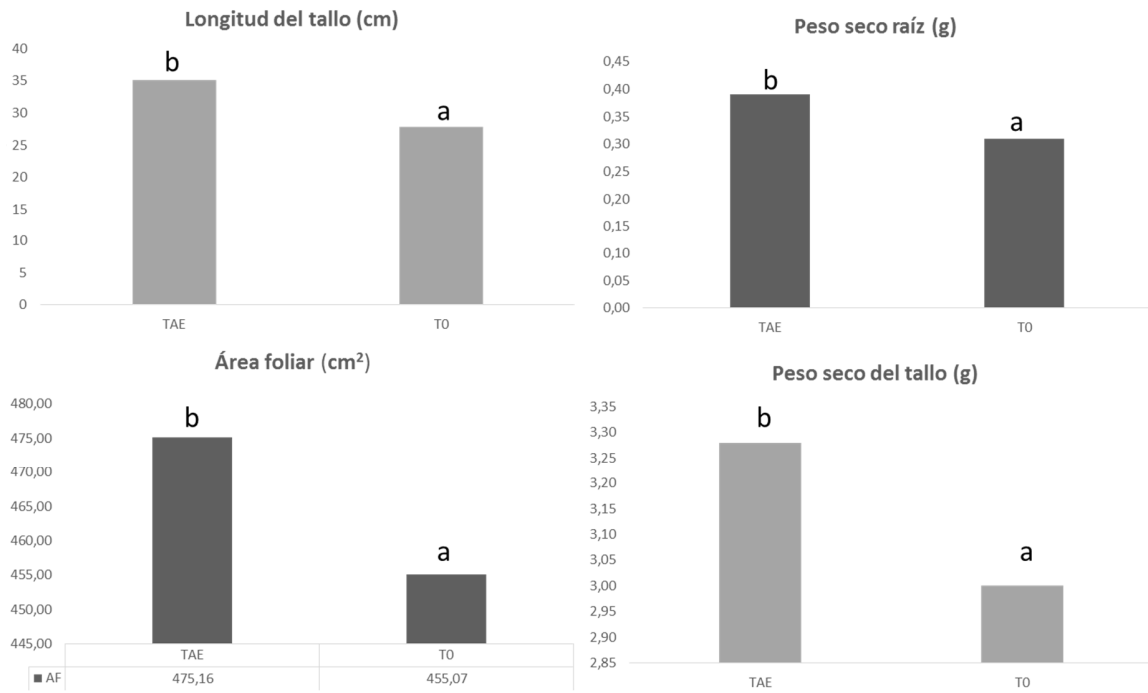


Figura 3

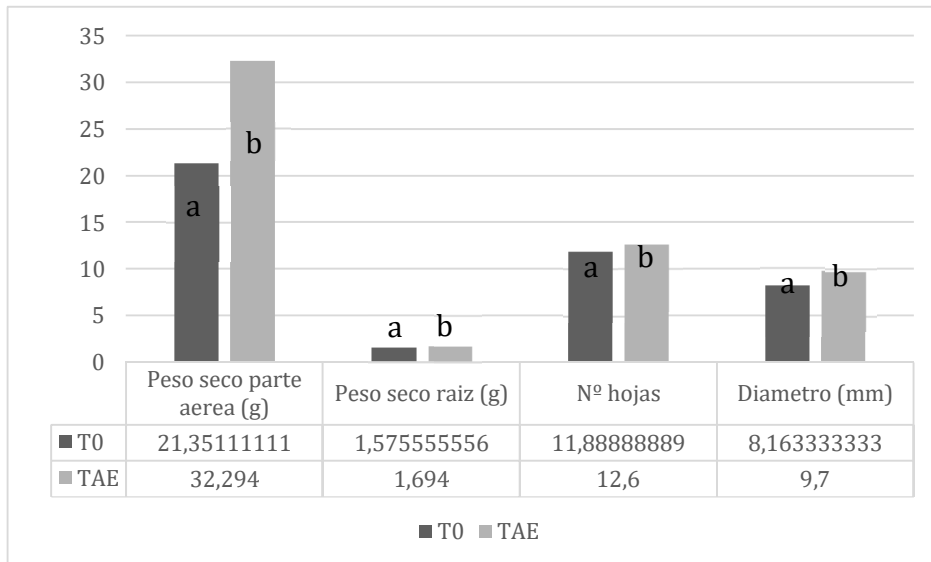


Figura 4

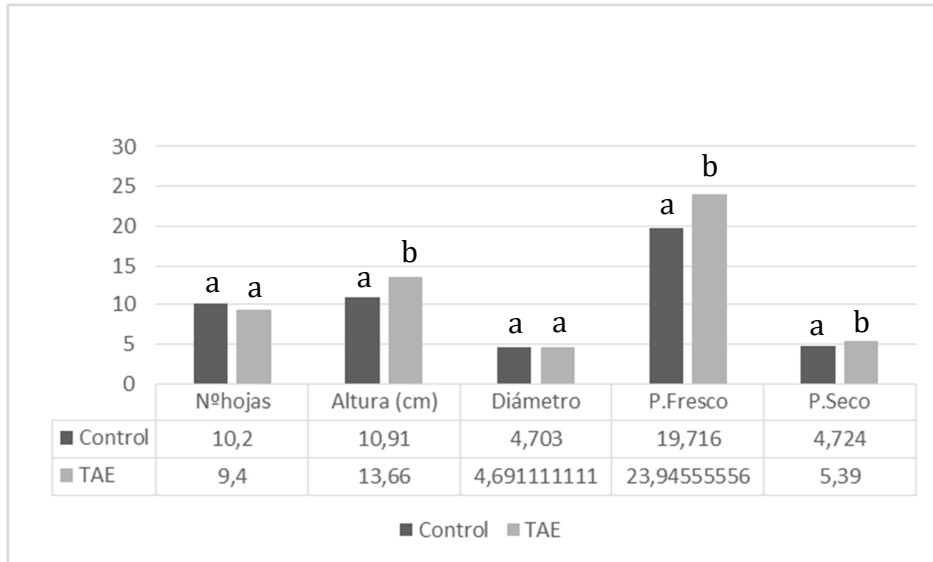


Figura 5

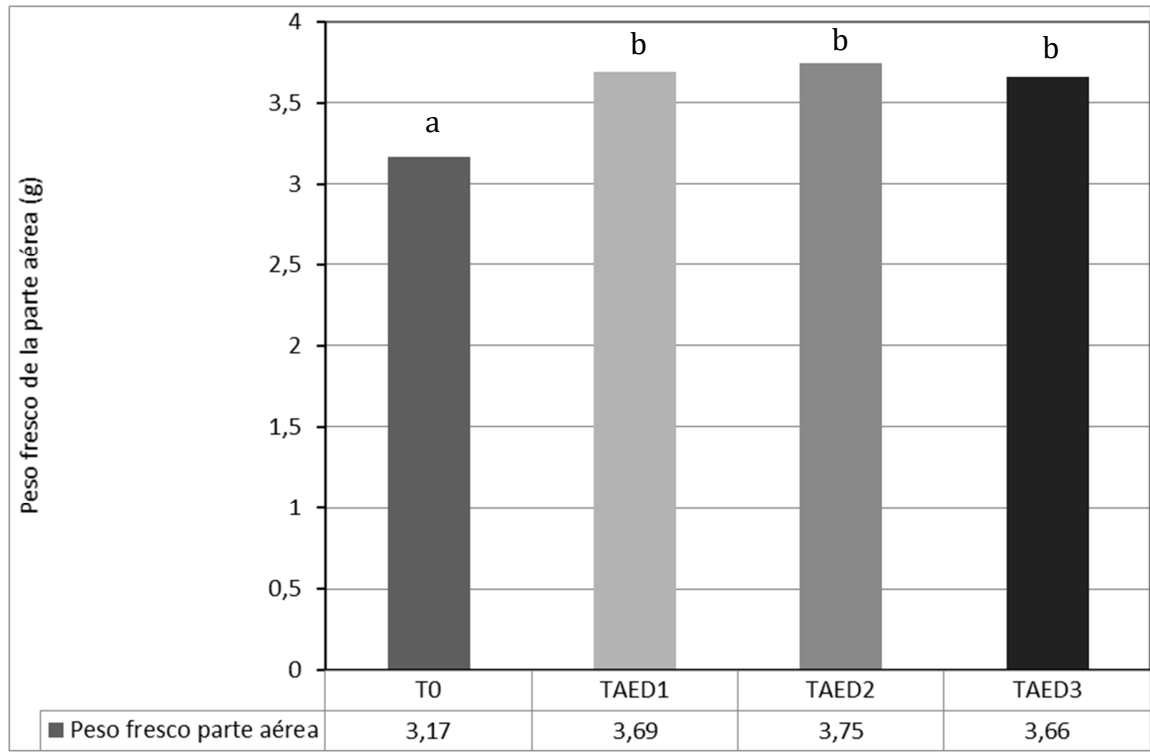


Figura 6

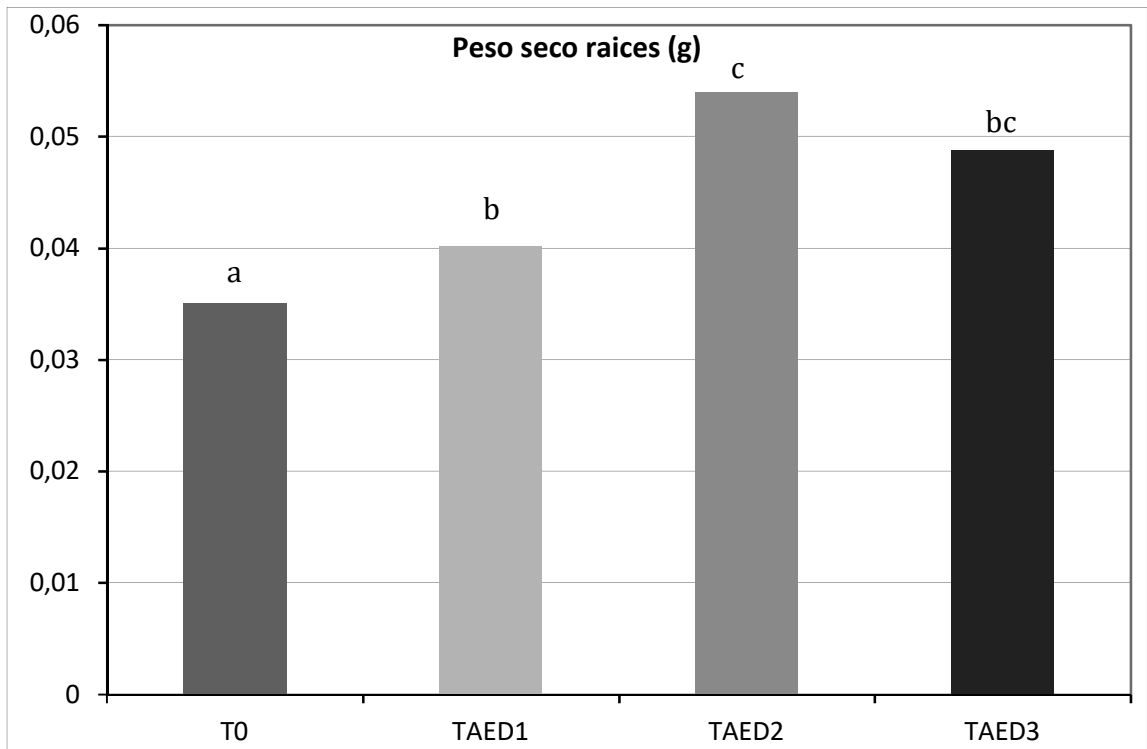


Figura 7

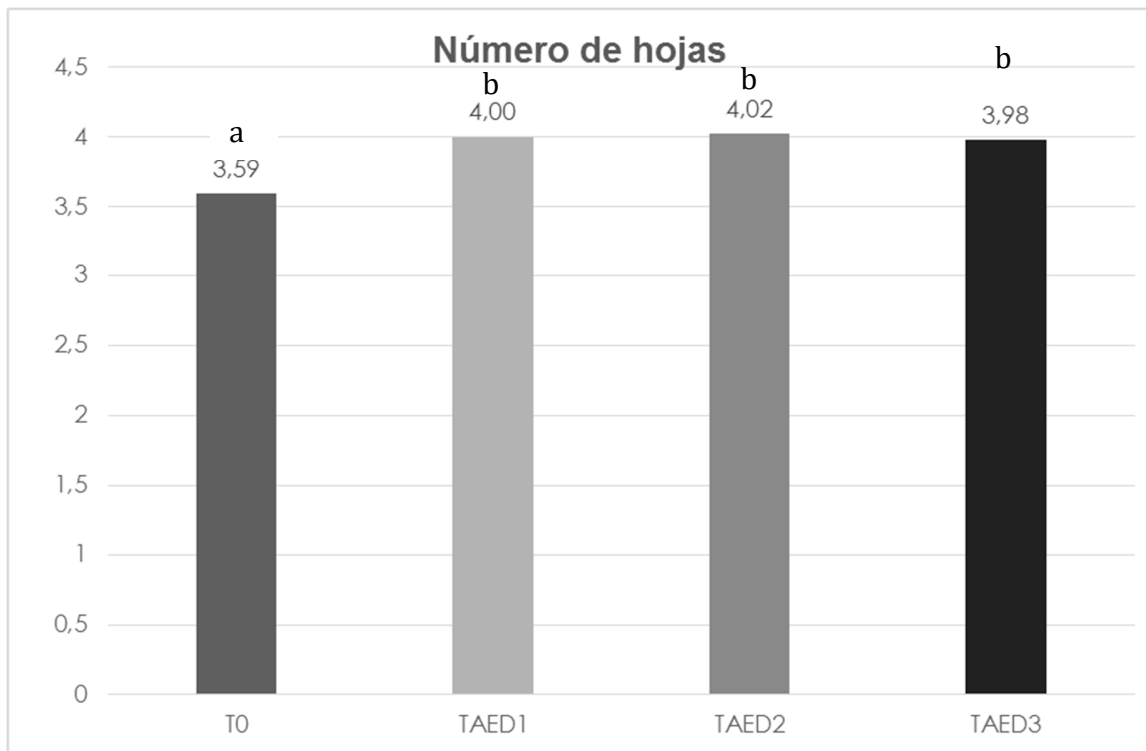


Figura 8

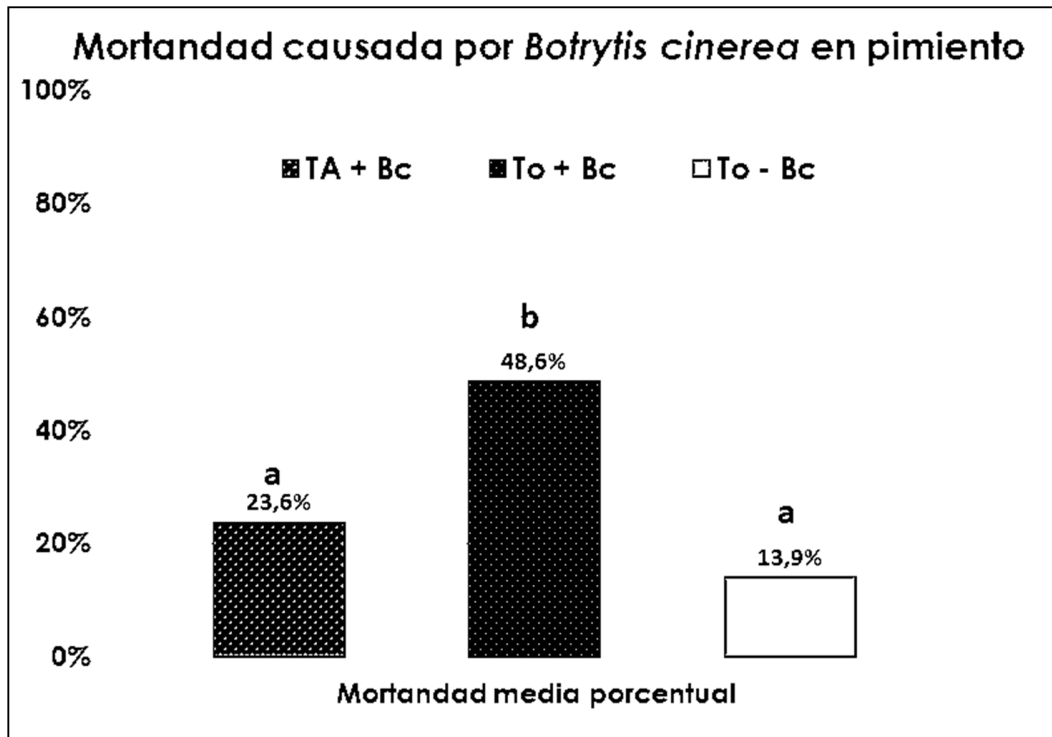


Figura 9

