



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

INVENTARIO



CSA126514

SOLICITUD

PCT

PATENTE DE INVENCION

Organización y
Digitalización CSA Ltda

10-86001

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TÍTULO**

MICROORGANISMOS NOVEDOSOS QUE CONTROLAN

PATOGENOS EN PLANTAS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE**

STICHTING DIENST LANDEBOUWKUNDIG ONDERZOEK

DOMICILIO

PH WAGENINGEN, HOLANDA (PAISES BAJOS)

74. **APODERADO**

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D.C.,**



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-086001- -00000-0000

Fecha: 2010-07-14 16:40:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 177

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

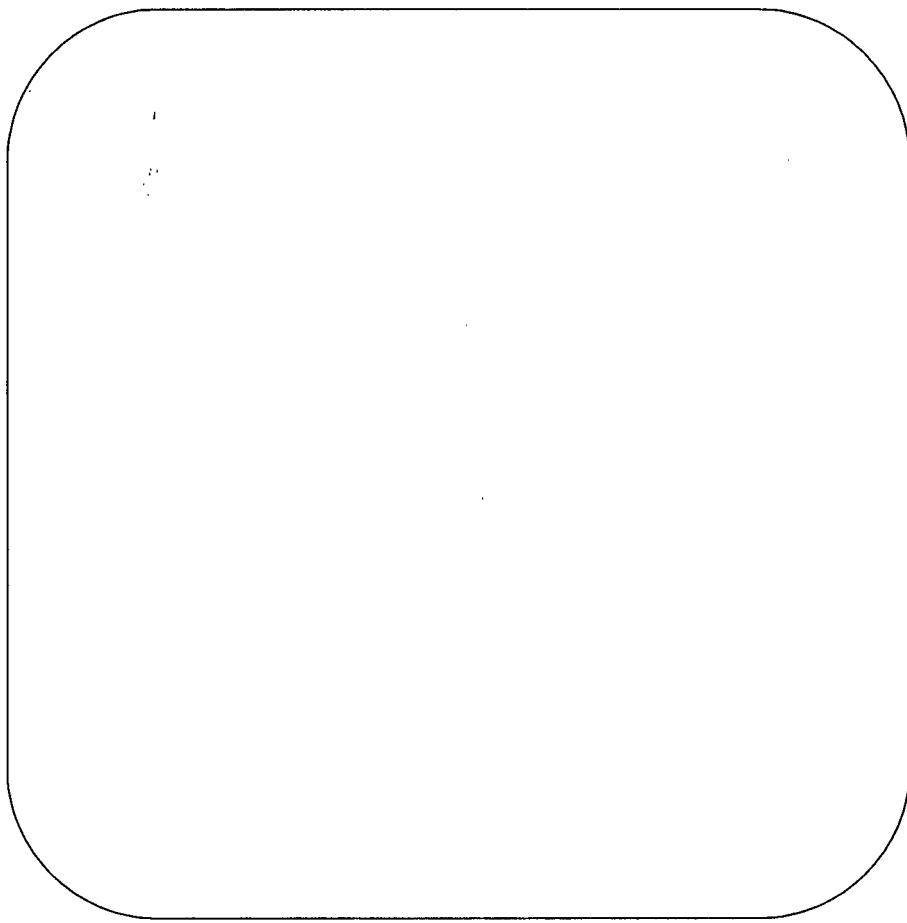
1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK sociedad constituida y existente bajo las leyes de Países Bajos. Dirección: Costerweg 50, NL-6701 BH Wageningen, Países Bajos Domicilio: PH Wageningen, Holanda		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE FÁEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@cavelier.com Domicilio: Bogotá, Colombia.		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>35.456.344</u> T.P <u>23.555</u>
4 INVENTOR (ES) (72)	1. Jürgen Anton KÖHL Wasserweg 42, 47533 Kleve, Alemania		
5 PCT (86)	Solicitud Internacional No. <u>PCT/NL2008/050794</u> Fecha: <u>12 de diciembre de 2008</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2009/078710 A1</u> Fecha: <u>25 de junio de 2009</u>		
6 Título (54)	<u>MICROORGANISMOS NOVEDOSOS QUE CONTROLAN PATÓGENOS EN PLANTAS</u> (folio 181)		
7 Clasificación Internacional (51)	<u>A01N 063/004</u> C12 P 1/02		
8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	<u>EP</u>	<u>14 de diciembre de 2007</u>	<u>07123275.5</u>
9	Comprobante de pago No.: <u>10-57,092</u> Comprobante de pago No.: <u>10-46,658</u> Comprobante de pago No.: <u>10-55,134</u>		Fecha: <u>12 de julio de 2010</u> Fecha: <u>8 de junio de 2010</u> Fecha: <u>6 de julio de 2010</u>

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 554.000.00.
- ☒ Comprobante de pago por 5 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$130.000.00.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ**FIRMA:**LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/078710 A1

Descripción:

Páginas 60 en el idioma original

Páginas 88 en español

Reivindicaciones: Número (s) 15

Figuras: Número (s) 5

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción del cambio de Solicitante de **PLANT RESEARCH INTERNATIONAL B.V., a STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK.**

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
25 June 2009 (25.06.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/078710 A1

(51) International Patent Classification:
A01N 63/04 (2006.01) C12F 1/02 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/NL2008/050794

(22) International Filing Date:
12 December 2008 (12.12.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
07123275.5 14 December 2007 (14.12.2007) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): PLANT
RESEARCH INTERNATIONAL B.V. [NL/NL];
Droevendaalsesteeg 1, NL-6708 PE Wageningen (NL).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): KÖHL, Jürgen Anton
[DE/DE]; Wasserweg 42, 47533 Kleve (DE).

(74) Agent: HATZMANN, M.J.; Verenigde, Johan de Witt-
laan 7, NL-2517 JR Den Haag (NL).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CI, CO, CP, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GE, GR, GT, GU, HK, HN, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, LA, LC, LI,
LK, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RU, SC, SD, SE, SG, SH, SI, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological
material furnished under Rule 13bis separately from the
description

(54) Title: NOVEL MICRO-ORGANISMS CONTROLLING PLANT PATHOGENS

(57) Abstract: The invention relates to control of pathogen caused diseases on leaves, fruits and ears in plants, such as apple scab
(Venturia inaequalis) by treatment of plant with an isolate of Cladosporium cladosporioides. The treatment is effective in both pre-
vention and treatment of the fungal infection.



WO 2009/078710 A1

P83408PC00

Title: Novel micro-organisms controlling plant pathogens

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to the field of plant pathogen control, particularly on leaves, fruits or ears, more particularly in fruit crops, such as apple, and particularly to the control of the fungal foliar disease apple scab (*Venturia inaequalis*).

BACKGROUND OF THE INVENTION

Apple scab is of major economic importance in the areas where apples are grown. If not controlled, the disease can cause extensive losses (70 percent or greater) where humid, cool weather occurs during the spring months. Losses result directly from fruit or pedicel infections, or indirectly from repeated defoliation which can reduce tree growth and yield.

Apple scab (see Fig. 1) can be observed on leaves, petioles, blossoms, sepals, fruit, pedicels, and less frequently, on young shoots and bud scales. The first lesions are often found on the lower surfaces of leaves as they emerge and are exposed to infection in the spring. Later, as the leaves unfold, both surfaces are exposed and can become infected. Young lesions are velvety brown to olive green and have feathery, indistinct margins. With time, the margins become distinct, but they may be obscured if several lesions coalesce. As an infected leaf ages, the tissues adjacent to the lesion thicken, and the leaf surface becomes deformed. Young leaves may become curled, dwarfed, and distorted when infections are numerous. The lesions may remain on the upper and lower leaf surface for the entire growing season; occasionally, the underlying cells turn brown and die, so that brown lesions are visible on both surfaces. The number of lesions per leaf may range from one or two to more than a hundred. The term "sheet scab" is often used to refer to leaves with their entire surfaces covered with scab. Young leaves with sheet scab often shrivel and fall from the tree. Infections of petioles and pedicels result in

premature abscission of leaves and fruit, respectively. In late summer or early fall, lesions may appear whitish due to the growth of a secondary fungus on the lesion surface.

Lesions on young fruit appear similar to those on leaves, but as the infected fruit enlarge, the lesions become brown and corky. Infections early in the season can cause fruit to develop unevenly as uninfected portions continue to grow. Cracks then appear in the skin and flesh, or the fruit may become deformed. The entire fruit surface is susceptible to infection, but infections early in the season are generally clustered around the calyx end. Fruit infections that occur in late summer or early fall may not be visible until the fruit are in storage. This symptom is called "pin-point" scab, with rough circular black lesions ranging from 0.004 to 0.16 inch (0.1 - 4 mm) in diameter.

Although research in New York has shown that the scab fungus can overwinter in trees as conidia on bud scales, the pathogen generally overwinters in leaves and fruit on the orchard floor. Ascospores are the major source of primary inoculum and are produced within pseudothecia that develop in leaves during the winter months. In a typical year in most locations, the first mature ascospores are capable of causing infections at about the time of bud break or soon thereafter. Ascospores continue to mature and are discharged over a period of five to nine weeks, with peak discharge during the pink to petal fall phenological stages. The length of time required for infection to occur depends on the number of hours of continuous wetness on the leaves and the temperature during the wet period. Young leaves remain susceptible for five to eight days, but their lower surfaces may become infected in late summer. For fruit, the duration of the wet period required for infection increases with the age of the fruit, which remains susceptible until harvest. Once the fungus is established in the leaf or fruit, conidia form on the surface of the lesion and become the source of secondary inoculum for the remainder of the season. Conidia are disseminated to developing leaves and fruit by splashing rain and wind. Several secondary cycles of conidial infection may

occur during the growing season depending upon the frequency of infection periods and the susceptibility of host tissue.

Management of apple scab is multifaceted, with resistant cultivars, sanitation, and chemicals all being used to some degree depending on the
5 orchard system being used and the goals of the grower.

Most of the major apple cultivars are susceptible to the fungus, although this varies somewhat. More than 25 scab-resistant cultivars have been released, included Prima, Priscilla, Jonafree, Redfree, Liberty, Freedom, Goldrush, and Pristine. Most are adapted to the more northern apple-growing
10 areas of the U.S. All scab-resistant cultivars vary in their susceptibility to other early-season diseases; and all are susceptible to the summer discases. Some recently released apple cultivars that have not been bred specifically for resistance to scab show varying levels of scab susceptibility, also.

Prevention of pseudothecial formation in overwintering apple leaves
15 would probably eliminate scab as a serious threat to apple production. Unfortunately, complete elimination of pseudothecia is not possible under orchard conditions with current methods.

Apple scab is controlled primarily with fungicide sprays. A variety of fungicide sprays with differing modes of action are available. When and
20 how they are used depends upon their mode of action. Protectant fungicides prevent the spores from germinating or penetrating leaf tissue. To be effective, they must be applied to the surface of susceptible tissue before infection occurs. Occurrence of infection can, amongst others, be predicted with an accurate weather forecast. Protectant fungicides are applied routinely
25 at 7 to 10 day intervals or according to anticipated infection periods.

Post infection fungicides control the scab fungus inside leaves and fruit. These chemicals can penetrate plant tissues to eliminate or inhibit lesion development. The ability of these fungicides to stop infections is limited to a few hours, or up to few days (depending upon the specific fungicide), and
30 their effect often varies according to temperatures during the first 24 to 48

hours after infection. Some fungicides can inhibit the fungus even later into the incubation period (the time between infection and the appearance of symptoms). Eradication of scab lesions after they appear does not usually occur, but can be achieved with the proper rate and timing of certain fungicides. The selection of fungicides for management of scab is based on several factors, including the entire spectrum of other diseases that must be managed at that time, the potential for resistance in the scab fungus to the selected chemical, the history of the disease in a particular orchard, the final market for the fruit, and other social and economic factors. Good horticultural practices, such as proper site selection, tree spacing and annual pruning, facilitates better chemical control by improving spray coverage and reducing the length of wet periods. Chemical fungicides used in the treatment or prevention of apple scab include maneb, mancozeb, captan, pyrimethanil and tolylfluanide.

There is thus still need for a natural fungicide, which is effective for the control of apple scab, and which is environment-friendly and non-toxic for humans and/or animals.

SUMMARY OF THE INVENTION

The inventors have found two new isolates of *Cladosporium cladosporioides*, i.e. *C. cladosporioides* H39, as deposited on 13 December 2007 under number CBS 122244 with the Centraal Bureau Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands and *C. cladosporioides* R406, as deposited on 13 December 2007 under number CES 122243 with the Centraal Bureau Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands. Said isolates are useful in a composition to control a plant pathogen of leaves, fruits and ears. Such a composition is preferably useful for diseases wherein said plant pathogen is selected from the group consisting of apple scab (*Venturia inaequalis*), pear scab (*Venturia pirina*), leaf spot (*Blumeriella jaapi*), rose black spot (*Diplocarpon rosae* / *Marssonina rosae*), brown spot

(*Stemphylium vesicarium*), powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*/*Sphaerotheca pannosa*), begonia mildew (*Microsphaera begoniae*), strawberry powdery mildew (*Sphaerotheca macularis*), sooty blotch (*Gloeodes pomigena*), fly speck (*Zygophiala jamaicensis*), peach leaf curl (*Taphrina deformans*), brown rot/spur canker (*Monilia fructigena*, *M. laxa*), pear rust (*Gymnosporangium sabinae*/*G. fuscum*), canker (*Nectria galligena*), rose black spot (*Diplocarpon rosae*), rust on roses (*Phragmidium tuberculatum*/*Phragmidium* spp.), *Botrytis* spp. in various plants, *Mycosphaerella brassicicola* in cabbage, *Mycosphaerella fijiensis* in banana, *Alternaria* spp. in *Brassica*, potato and various other plants, *Fusarium* spp. especially in cereals including maize, *Phytophthora infestans* of potato and *Plasmopara viticola* in grapevine, more preferably wherein said fungal foliar pathogen is apple scab.

Further, in such a composition the *Cladosporium* is present as spores and further comprises a carrier for the *Cladosporium* spores, preferably wherein said carrier is glucose. Alternatively, the composition can comprise an extract of the *Cladosporium* of the invention.

In another embodiment, the invention comprises a method to control a pathogen in plants, comprising treating said plants with a composition according to the invention. Preferably, said composition is sprayed on the leaves, fruits or ears of the plant. Such a method for control of the pathogen comprises prevention of infection and/or a decrease of plant damage caused by said pathogen. Said method will be usable against any pathogen mentioned above, preferably against apple scab. A further embodiment in the present invention is the use of a *Cladosporium* isolate according to the invention, or a composition according to the invention for the prevention or treatment of infection of leaves, fruits or ears of a plant by a pathogen. Further comprised in the invention is a *Cladosporium* strain or a composition according to the invention for use in the control of a plant pathogen infection.

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1 Scab symptoms caused by *Venturia inaequalis* (Vi) on
 5 leaves (a) and fruit (b).

Fig. 2. Conidia production of Vi on apple leaves treated twice per
 week with *Cladosporium cladosporioides* H39 or R406 (approximately 2×10^6
 viable spores ml⁻¹) in an organically managed orchard. Randwijk 2007.
 Statistically significant effects of individual treatments in comparison with the
 10 control treatment are indicated by “*” separately per sampling date; one-sided
 unprotected LSD-test; ($\alpha = 0.05$). N.s.: no significant difference; n.v.: no value

Fig. 3. Predicted infection periods, dates of spray applications of
Cladosporium cladosporioides H39 and sulphur, and sampling dates (L:
 Labelling of new leaves; S: Sampling).

15 Fig. 4. Effect of treatments with conidia of *Cladosporium*
cladosporioides H39 or sulphur on conidia production of *Venturia inaequalis*.
 Bars of the same sampling date with a common letter do differ significantly
 (LSD-test; $\alpha = 0.05$).

Fig. 5. Effect of treatments with conidia of *Cladosporium*
 20 *cladosporioides* H39 or sulphur on scab severity. Bars with a common letter do
 differ significantly (LSD-test; $\alpha = 0.05$).

DETAILED DESCRIPTION

25 As detailed above, apple scab is a disease with tremendous
 economical impacts for the apple growers. This is especially the case for apple
 scab control by organic farmers, who have few or no alternative chemical
 pesticides, especially now that some of the agents, which are commonly used
 are tending to be phased out because of environmental and general toxicity
 30 risks.

An alternative is being sought in the form of extracts from plants, since plant extracts have been described to be possible candidates for treating fungal diseases and since these would comply with the requirements for organic growing. Recently, the use of extracts from *Yucca* has been
5 documented (WO 2007/139382).

However, next to plant extracts also natural occurring micro-organisms are useful in the control of plant pathogens. Especially many fungi are known because of their biocidal effects, such as *Penicillium* and *Trichoderma*. More specifically, there also exist fungi which are especially
10 useful against plant pathogens. Also in the case of apple scab such fungi have been discovered, such as *Chaetomium globosum* (Boudrau, M.A. et al., 1987, Phytopathol. 77:1470-1475), *Microsphaeropsis ochracea* (Carisse, O. et al., 2000, Phytopathol. 90:31-37), *Ophiostoma* sp. and *Phoma* sp. (Quimet, A., et al., 1997, Can. J. Bot. 75:632-639). General overviews may be found in Burr,
15 T.J. et al., 1996, Biol. Control 6:151-157 and Fiss, M. et al., 2003, Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz, 110(6):513-523. Recently, it has been disclosed (Ziedan, E.H.E., 2006, Res. J. Agric. & Biol. Sci. 2(6):262-267) that an isolate of *Cladosporium cladosporioides*, derived from the phyllosphere of grapevine, administered together with benzoic acid was effective against the
20 grapevine downey mildew causing fungus *Plasmopara viticola*. Also was found that particular isolates of *Cladosporium cladosporioides* can be used against *Botrytis* and *Fusarium* infections (Newhook, F.J., 1957, New Zealand Journal of Science and Technology 23:23-54. Eden et al., 1996, Plant Pathol. 45:276-284).

25 In the present invention it has now been discovered that two isolates of *Cladosporium cladosporioides* are effective against fungal foliar pathogenic diseases, such as apple scab. These two isolates are *Cladosporium cladosporioides* H39 and *Cladosporium cladosporioides* R406, deposited on 13 December 2007 with the Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, the
30 Netherlands under nrs. CES 122244 and CES 122243, respectively. As is

shown in the experimental section of the specification, these two new isolates had a clear effect on apple scab development, while other isolates of *Cladosporium cladosporioides* did not have any effect.

Cladosporium cladosporioides (Fresen.) de Vries belongs to the group of the *Fungi imperfecti* and its growth is characterized by colonies of about 3 cm in diameter when grown for seven days on potato-dextrose agar at 20°C.. Colonies of *Cladosporium cladosporioides* are effuse, olive green or olivaceous brown, velvety; reverse on malt agar greenish black. Conidiophores are macronematous and micronematous, sometimes up to 350µ long but generally much shorter, 2-6µ thick, pale to mid olivaceous brown, smooth or verrucose. Ramo-conidia are 0-1 septated, up to 30µ long, 2-5µ thick, smooth or occasionally minutely verrucose. Conidia are formed in long branched chains, mostly 0-septated, ellipsoidal or limoniform, 3-11 x 2-5 (mostly 3-7 x 2-4)µ, pale olivaceous brown, most commonly smooth but verruculose in some strains (Ellis, M.B., 2001, Dematiaceous Hyphomycetes).

It has been reported that one of the metabolites, cladosporin, acts as antifungal. This cladosporin has been shown to have antibiotic properties (Scott, P.M. et al., 1971, J. Antibiotics 24:747-755). Yet, as already discussed above, it was found in our experiments that not all isolates of *Cladosporium cladosporioides* had an inhibitory effect on apple scab infection. Apparently, either cladosporin is not functional against *Venturia inaequalis*, or, more likely, the isolates of the fungus differ in their phenotype of cladosporin expression and secretion. Possibly, also other mechanisms of mode-of-action are involved in antagonism of H39 and R406 towards *Venturia inaequalis* and other plant pathogens.

Cladosporium spp. are common epiphytic colonizers of leaf surfaces, often found in high densities (Dickinson, 1981). Epiphytic colonization by *Cladosporium* spp. is also reported for apple leaves (Fiss et al, 2000) and fruits (Teixido et al., 1999). Such epiphytic populations of *Cladosporium* spp. may contribute to naturally occurring intrinsic biological control. In this case,

13

conservation biological control (Eilenberg *et al.*, 2001) protecting such beneficial populations by avoiding fungicides with side effects on non-target populations (Teixido *et al.*, 1999; (Walter *et al.*, 2007) or even selectively stimulating such naturally occurring beneficial populations, e.g. by application
5 specific nutrients, may contribute to scab prevention.

As is shown in the Examples, the two isolates of the present invention showed a clear effect in the control of apple scab. It is further submitted that not only apple scab but any fungal plant pathogen of leaves,
10 fruits or ears can be controlled by said isolates. Said fungal foliar pathogen is selected from the group consisting of apple scab (*Venturia inaequalis*), pear scab (*Venturia pirina*), leaf spot (*Elumeriella jaapi*), rose black spot (*Diplocarpon rosae* / *Marssonina rosae*), brown spot (*Stemphylium vesicarium*), powdery mildews of various plants such as strawberry, roses and apple, sooty
15 blotch (*Gloeodes pomigena*), fly speck (*Zygophiala jamaicensis*), peach leaf curl (*Taphrina deformans*), brown rot/spur canker (*Monilia fructigena*, *M. laxa*), pear rust (*Gymnosporangium sabinae* / *G. fuscum*), canker (*Nectria galligena*), rose black spot (*Diplocarpon rosae*), rust on roses (*Phragmidium tuberculatum* / *Phragmidium spp.*), *Botrytis* spp. in various plants,
20 *Mycosphaerella brassicicola* in cabbage, *Mycosphaerella fijiensis* in banana, *Alternaria* spp. in *Brassica*, potato and various other plants, *Fusarium* spp. especially in cereals including maize, *Phytophthora infestans* of potato and *Plasmopara viticola* in grapevine, preferably wherein said fungal foliar pathogen is apple scab.

25 It appeared in the case of H39 that the way of culturing and the formulation of the fungus had a marked influence on the inhibitory effect. Conidia of *C. cladosporioides* H39 produced on oat meal agar were not effective under orchards conditions but those produced on oats in an fermenter consistently showed moderate effectivity. Microscopical observations showed
30 that conidia produced on oats in an fermenter were larger than those produced

on oat meal agar. The effect of growth medium on the spore quality of antagonists resulting in a better performance under environmental stress conditions has been demonstrated for several other antipathogenic fungi, e.g. cells of *Candida sake* produced on low-*a_w*-modified media (Teixido *et al.*, 1999).
5 Colonization of apple leaves by introduced fungi depends on the biology of the introduced species (Kinkel *et al.*, 1989). In their case study, introduced populations of *C. globosum* significantly decreased within a few days in contrast to populations of *A. pullulans*. In the below experiments, the inhibitory compositions were applied at 3 to 4 days interval to guarantee high
10 populations level on the leaves. However, first results on population dynamics of *Cladosporium cladosporioides* indicate that after application of H39 such populations increased and that such treatment effects were found even after several weeks (see example 2).

Formulation of the fungus is important for the viability of the fungal
15 spores contained in the composition that is applied to the plant. It has appeared that a formulation wherein glucose is used as carrier for the *Cladosporium* spores performs better than unformulated fungus.

Alternatively, an antifungal composition of the present invention may contain an extract of one or both of the *Cladosporium* isolates of the
20 invention. Extracts of the two isolates can be obtained as described in the literature for other *Cladosporium* extracts, and can be readily obtained by a person of skill in the art (see e.g. Ding, L. *et al.*, 2008, Current Microbiol., 56:229-235).

Further, the composition may contain additional compounds that are
25 commonly used in spraying solutions, such as preservatives, surface active compounds, wetting agents, and the like. It is also possible to include further antifungal compounds or organisms in the composition to enhance the inhibitory effect. In such a case, lower levels of traditional chemical fungicides can be used, thereby enabling a desired reduction in the amount of fungicides.
30 As discussed above, the chemical fungicides reduce the growth of the plant

pathogenic fungus, and thus will allow for a prolonged opportunity for the *Cladosporium* to achieve its effect. It is thus submitted that a combination of the isolates of the present invention with suitable chemical fungicides will synergistically inhibit the fungal foliar pathogen thereby exceeding beyond a
5 simple addition of the individual effects. Also a combination of the isolates of the invention with any other microbial fungal foliar pathogen antagonist will be useful in the present invention.

Another embodiment of the invention is a method to control a fungal pathogen on leaves, fruits and ears, comprising treating said plants with a composition
10 according to the invention.

In such a method plants are sprayed with a composition according to the invention before or after an infection with the plant foliar pathogen. Spraying before infection will be useful to prevent an infection. Although, if the spores of the isolates are not completely viable, such anaphylactic spraying should be
15 repeated regularly. If the spores are sufficiently viable, the *Cladosporium* isolate will be able to grow in the phyllosphere of the plant, thus providing a long-lasting protection by preventing infections and reducing pathogen sporulation, thus slowing down epidemics. Furthermore, the *Cladosporium* isolate will reduce ascospore production in overwintering apple leaves and of
20 spores of other plant pathogens in their residues which will result in less disease in the following season.

Once an infection has occurred, spraying should be performed regularly in order to effectively control the disease.

Treatment with a composition according to the invention can be done both pre-
25 harvest, i.e. when the fruits are still on the plant, but also post-harvest. It is shown in the experimental part that also post-harvest treatment is effective to combat fungal infections.

Yet another embodiment of the invention is the use of a *Cladosporium* strain according to the invention, or a composition according to the invention for the
30 prevention or treatment of infection by a fungal foliar pathogen.

A further embodiment of the present invention is a *Cladosporium* strain as identified above, or a composition according to the invention for use in the control of a fungal foliar pathogen infection.

5

EXAMPLES

Example 1 *In vitro* and field tests 2006

10 Material and Methods

Collection of candidate antagonists

Scab infected apples leaves were collected in September 2004 at 216 locations in The Netherlands, Belgium, and northwest and central Germany. Sampling locations were recorded by GPS. Most samples, consisting of 10 - 50 leaves, originated from old standard tress or abandoned orchards without any cropping management. From each sample, green leaves with sporulating colonies of *V. inaequalis* were incubated for 3 days at 20 °C in moist chambers. Thereafter, *V. inaequalis* colonies were visually inspected at 10 to 60 x magnification for development of fungi different from *V. inaequalis*. Fungal mycelium or spores were isolated from the aerial parts of the colony with a sterile needle and transferred to oat meal agar (20 g oat meal, 15 g agar, 1000 ml tap water) and V8 agar (200 ml V8 juice, 3 g CaCO₃, 20 g agar, 1000 ml tap water), both containing 100 mg l⁻¹ streptomycine and 15 mg l⁻¹ tetracycline. Pure cultures were prepared from the developing colonies.

25

Pre-screening of candidate antagonists

A rapid throughput system was used for a first check of candidate antagonists regarding their potential risks and economical feasibility of the development of a biocontrol product. Fungi belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium* or *Fusarium* were discarded because of the potential of various species within

30

these genera to produce mycotoxins. The remaining isolates of hyphal fungi were cultured in Petri dishes on oat meal agar for 21 days at 18°C and 12 h per day blacklight; yeasts were cultured on basal yeast agar (10 g bacteriological peptone, 1 g yeast extract, 20 g glucose, 20 g agar, 1000 ml tap water) for 5 days at 18°C. For each isolate, the production of spores or yeast cells per plate was determined with the aid of a haemocytometer after preparation of suspensions using sterile tap water containing 0.01% Tween 80. Isolates producing less than 1×10^5 spores or yeast cells per plate were discarded. Ten μ l of the suspensions were plated in duplicate in sterile wells, 16 mm in diameter containing 1.5 ml malt agar (1 g malt extract, 15 g agar, 1000 ml tap water). Different plates with inoculated wells were incubated at 5, 18 and 36°C in the dark for 14 days. An additional plate with wells containing malt agar adjusted to approximately -10 and -7 MPa by adding KCl_2 were incubated at 18°C for 14 days. Wells were inspected for fungal growth and fungi producing colonies at 36°C and those not producing colonies at 5°C or at -10 or -7 MPa were discarded. Remaining isolates were stored on potatoe dextrose agar (Oxoid, 39 g, 1000 ml tap water) at 4°C until further use.

Production of fungal inocula

Conidia of the monospore isolate ME 363E of *V. inaequalis* obtained from M. Bengtsson, Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg C, Denmark, were produced following the method of Williams (1976). Duran bottles (500 ml) with 40 ml potato dextrose broth (24 g l⁻¹) and a wick of cheese cloth sized 10 x 25 cm spread on the inner surface of the bottle, the lower part touching the medium, were autoclaved and inoculated with 250 μ l of a suspension of mycelial fragments of *V. inaequalis*, prepared by flooding a culture of the fungus grown on potatoe dextrose agar with sterile water and gently rubbing with a sterile rubber spatula. Inoculated bottles were incubated at 18°C in the dark. During the first 4 days, bottles were incubated at horizontal position so that most of the wick was covered by the broth,

thereafter bottles were incubated in an upright position. Bottles were carefully rolled at day 2, 7 and 11 to distribute the broth with growing mycelium on the entire surface of the wick. After 14 days, the nutrient broth was decanted and 200 ml sterile tap water was added and the bottles were shaken thoroughly by hand for several minutes. The resulting conidial suspension was filtered through sterile nylon gauze with a mesh of 200 µm and centrifuged at 5800 g for 30 min at 6°C. The pellet with conidia was re-suspended in tap water; the conidial concentration was determined with the aid of a haemocytometer and adjusted to 5×10^5 spores ml⁻¹ by adding sterile tap water. The suspension was stored at -18°C until use. The yield was approximately 3×10^6 conidia per bottle.

For the screening experiments, candidate isolates of hyphal fungi were grown on oat meal agar for 28 days at 18°C and 12 h blacklight per day; yeasts were grown on basal yeast agar for 5 days at 13°C. Suspensions of spores or yeast cells were prepared by flooding cultures with sterile tap water containing 0.01% Tween 80, gently rubbing with a sterile rubber spatula and filtration through sterile nylon gauze with a mesh of 200 µm. Concentrations of the suspensions were determined with the aid of a haemocytometer and concentrations were adjusted to 1×10^6 spores or cell ml⁻¹ by adding sterile tap water containing 0.01% Tween 80.

For applications in the orchards, fungi were produced in the same way but concentrations were adjusted to 2×10^6 spores ml⁻¹. Conidia of 2 isolates were also produced in a fermenter, dried and formulated as wettable powder and stored at 5°C. Viability of dried conidia was determined before the beginning of the field experiments on agar. The concentration of conidial suspensions was adjusted to 2×10^6 viable conidia ml⁻¹. Viability of spores in the suspensions applied to the field was always checked again by spraying suspension on malt extract agar (1g malt extract per liter) amended with tetracycline at 15 mg l⁻¹ and streptomycine at 100 mg l⁻¹ in the orchard and assessing the percentage of germinated spores after incubation at 20°C for 24 h.

Seedling assay

Seeds of apple cv Golden Delicious (G.J. Steingaesser & Comp. GmbH, Miltenberg, Germany) were seeded in moist sand and stratified at 4°C for 6 weeks in the dark. Thereafter, seeds were further grown in the moist sand at room temperature and daylight. After approximately 14 days, young seedlings were transplanted into potting soil, one seedling per pot (6 cm square, 8 cm height). Seedlings were grown for 28 days with cycles of 16 h light at 18°C and 8 h dark at 12°C. Plants used in experiments had at least 4 fully expanded leaves.

Seedlings were sprayed with conidial suspensions of *V. inaequalis* (1×10^5 ml⁻¹) until run-off and placed in a moist chamber consisting of a plastic trays closed by a transparent plastic top. After 2 days incubation at 15°C with diffuse light, tops were removed from the trays and seedlings further incubated for 3 or 4 days at 85% RH, 15°C and 16 h light per day. Thereafter, *V. inaequalis*-inoculated seedlings were sprayed with suspensions of the above found isolates or water containing 0.01 % Tween 80 as control. Two seedlings were used for each replicate of each treatment. The sets of 2 inoculated seedlings were placed in a polyethylene tent in a block design with 6 blocks (replicates) and complete randomization within blocks. Touching of leaves of neighbouring plants or the polyethylene was avoided. Seedlings were grown for 9 to 12 days at 15°C, with 16 h light per day at 138 µE s⁻¹ m⁻².

From both seedlings of each replicate, the lowest 5 true leaves (experiments 1 – 5) or the youngest just unfolded leaf at the beginning of the experiment (labelled with a metal ring; ‘young leaves’) and the 3 next elder leaves (experiments 6 – 14; ‘old leaves’) were carefully removed. Leaves of each replicate set of leaves were pooled, put into Duran bottles (100 ml) containing 15 ml of tap water with 0.01% Tween 30 for samples containing 2 youngest leaves or 30 ml for samples of containing 10 (exp 1 – 5) or 6 (experiments 6 - 14) leaves. Bottles were shaken with a flask shaker at 700 OCS min⁻¹.

Concentration of conidia of *V. inaequalis* was determined for each suspension with the aid of a haemocytometer. Leaf surfaces of each replicate set of leaves were measured with an area meter (Li-COR Biosciences, model 3100, Lincoln, U.S.A.).

5

Orchard assay

Several rows of var. Jonagold within an organically managed orchard at Randwijk, The Netherlands, were pruned during spring and summer 2006 so that trees produced new shoots with young leaves highly susceptible for *V. inaequalis*. Depending on tree development and growth conditions for the trees pruning was carried out approximately 3 to 5 weeks before a set of trees was used for an experiment. Also the majority of young fruits were removed from the trees to stimulate the development of new shoots. Trees used for experiments in early summer (experiments 1 to 4) were not treated for scab control in 2006. Trees used in later experiments after half of July were treated with a sulphur schedule as common for the organic orchard in the early season to slow down the scab epidemic but remained untreated at least 3 weeks before and during the experiments.

A series of 8 experiments was carried out, each on a different set of trees. For each experiment 2 to 6 trees, depending on the number of newly produced shoots per tree, were chosen for each of 6 blocks (replicates). Within each block, 7 treatments were carried out. For each treatment (per replicate) 3 shoots were used which were produced on the same branch. Shoots were labelled with coloured metal rings so that the 2 youngest leaves fully expanded at the day of the first treatment could later be distinguished from the other leaves of the shoot. Treatments consisted of spraying tap water containing 0.01 % Tween 80 as control, or suspensions of freshly produced spores of the antagonist *C. cladosporioides* H39. Separate treatments were carried out with fermenter-produced spores formulated as dry powders and resuspended in tap water containing 0.01 % TWEEN 80. Spray applications were done using a

25

compressed air-driven knapsack sprayer at 250 kPa until run-off. The different experiments were carried out in the period between 22 June and 28 September 2006. Experiments started with the first treatment 1 to 3 days after an infection period for *V. inaequalis* had been predicted according to the Mills
5 table based on leaf wetness duration and temperature. Starting dates for the 8 experiments were 22 June, 29 June, 6 July, 31 July, 3 August, 7 August, 21 August, 24 August, and 24 August 2006. In experiment 3 the period between expected infection period and first application was prolonged to 10 days, but leaves were labelled already 1 to 3 days after the expected infection period as
10 in the other experiments. During all experiments, subsequent treatments were carried out at 3 to 4 day intervals. In the first 3 experiment, leaves were sampled 18 days after the first treatment (and thus 19 to 21 days after an expected infection period). In experiments 4 to 7, leaves were sampled 24 to 25 days after the first treatment (and thus 25 to 28 days after an expected
15 infection period) to increase the time period for *V. inaequalis* sporulation and for possible antagonistic interactions. In experiment 8, leaves were sampled 24 days after the first application and thus 34 days after the expected infection period.

In each experiment, the 2 youngest leaves fully expanded at the beginning at
20 the experiment together with the 2 next younger leaves (expanded during the course of the experiments) were pooled for the 3 shoots belonging to the same replicate so that a sample consisted of 12 leaves ('young leaves'). From the same shoot, the next elder 3 to 12 leaves, depending on shoot size, were also sampled and pooled so that samples consisted of 9 to 36 leaves ('elder leaves').
25 The average number of elder leaves sampled in the different experiments was 21.8. Samples of young leaves were put into 250-ml glass bottles. Within 2 h, 100 - 150 ml (depending on amount of leaves) of tap water with 0.01% Tween 80 was added and bottles were shaken with a flask shaker at 700 OCS min⁻¹ for 10 min. Samples of older leaves were processed in the same way using
30 1000-ml plastic bottles with 150 - 350 ml (depending on number of leaves) of

tap water added before shaking. From the obtained suspensions, sub-samples of 6 ml were stored at -18 °C. The concentration of conidia of *V. inaequalis* was determined for each suspension with the aid of a haemocytometer. The leaf surface of all leaves per sample was measured with an area meter.

5

Statistics

The number of *V. inaequalis* conidia produced cm⁻² leaf was calculated per replicate. If no conidia were detected, a detection limit was set at one conidium counted in the conidial suspension, resulting in an average detection limit for the various experiments of approximately 100 conidia cm⁻², e.g. ranging, depending on the leaf surfaces for the various replicates, between 74 and 212 cm⁻² for the first 3 experiments conducted under controlled conditions. Data obtained for 2 different leaf ages were natural logarithmic-transformed and analysed separately per leaf age by ANOVA. Experiments conducted under controlled conditions were analysed separately by comparing means of the control treatments and the individual antagonist treatments using unprotected LSD-tests ($\alpha = 0.05$). Since P-values of ANOVAs often were greater than $P = 0.05$, no further multiple comparisons between antagonist treatments were made (Ott and Longnecker, 2001). For the field experiments, natural logarithmic-transformed data obtained for 2 different leaf ages were analysed separately per leaf age by ANOVA with a block design, with individual experiments considered as main blocks and treatments were randomized within the 6 replicate blocks of each experiment. Statistically significant treatment effects (protected LSD-tests; $\alpha = 0.05$) were indicated.

20
25

Results

Isolation of fungi from *V. inaequalis* colonies and pre-screening

Growth of fungi different from *V. inaequalis* was frequently observed in sporulating colonies of the pathogen and several hundreds of fungal isolates were obtained. Isolates were grouped according to colony appearance and in

30

total 148 isolates representing various colony types were tested in the pre-screening. 131 out of the 148 isolates produced more than 1×10^5 spores or yeast cells per plate and grown at different temperatures and water potentials. From these remaining 131 isolates, all were able to grow at 5 °C; 16 did not
5 grow at -10 MP. 14 grew at 36 °C of which 1 isolate did not grow at WP = -10MPa. Since many of such isolates with the preferred combination of characteristics belonged to *Cladosporium* spp., only a sub-set of randomly chosen isolates of this group was tested on seedlings. In total, 63 out of the 102 isolates were further tested in bio assays on apple seedlings.

10

Seedlings tests

Fourteen experiments on seedlings were carried out. In the control treatments of the first 5 experiments, the conidia production on the five youngest leaves of the seedling was on average 3596 conidia cm⁻² and ranged for the different
15 experiments between 1339 and 10509 conidia cm⁻² (backtransformed values). Since conidia production was high on the youngest leaf and much less on the elder leaves it was decided to sample such leaves separately in the subsequent experiments. In experiment 6 – 14, average conidiation on the young leaf was 2896 conidia cm⁻² and ranged for the different experiments between 728 and
20 6186 conidia cm⁻² (backtransformed values). For elder leaves, average conidiation was 453 conidia cm⁻² and ranged for the different experiments between 144 and 1313 conidia cm⁻² (backtransformed values). Variation in conidiation was not only high between experiments but also within experiments between sets of replicate seedlings.

25 Most of the 30 candidate isolates tested on seedlings did not statistically significantly reduce conidiation of *V. inaequalis*. One isolate, *C. cladosporioides* H39 caused a significant reduction of *V. inaequalis* on the young or elder leaves which could be repeated in subsequent independent experiments. However, efficacies (calculated on base of backtransformed
30 values for young leaves) of this antagonist varied between 55 to 79 % for *C.*

24

cladosporioides H39 in the experiments in which it was tested and conidiation reduction was in some cases not statistically significant (Table 1). A few more isolates showed a strong statistically significant antagonistic effect in one experiment but such effects could not be repeated. Such isolates belonged to *A. pullulans*, *C. cladosporioides*, *P. pinodella*, and *Cladosporium* spp. In no case significant enhancements of conidiation of *V. inaequalis* after application of candidate isolates was observed.

Orchard testing 2006

- 10 Apple scab developed moderately in the orchard before the first experiment started at 22 June. In June and first half of July, dry conditions accompanied with day temperatures often above 30 °C were not favourable for further apple scab development. Thereafter, rainy and cold weather was strongly favourable for apple scab until the end of the experiments.
- 15 During the first 3 experiments conducted under dry and warm conditions, 2.1 to 12.8 x 1000 conidia cm⁻² (backtransformed values) were found on young leaves and 9.5 to 40.3 x 1000 conidia cm⁻² on elder leaves on water treated control plots (Table 2 A, B). After weather had changed to moist and cold conditions half of July, 46.3 x 1000 conidia cm⁻² on young leaves and 9.8 x 1000
- 20 conidia cm⁻² were found on leaves from control treatments in experiment 4. During the subsequent experiments conidia numbers increased to 227.3 x 1000 conidia cm⁻² on young leaves and 132.1 conidia cm⁻² on elder leaves in experiment 8.
- Viability of spores applied at the 25 application dates during the course of the
- 25 series of experiments was assessed for each suspension on one agar plate sprayed in the field. Viability of *Cladosporium* sp. H39 was 92 % (ranging from 32 to 99 %). Formulated spores of *C. cladosporioides* H39 had a viability of approximately 47% at the beginning of the experiments. When spore suspensions were prepared for field applications, formulated spores of *C.*
- 30 *cladosporioides* H39 formed clusters consisting of approximately 5 to 50 spores

in the spraying suspensions so that a precise determination of spore germination was not possible. The majority of clusters of suspensions sprayed in the 11 applications showed fungal growth. Only few spore clusters applied between 10 August and 29 August showed fungal growth. It can be assumed that stored formulated spores had been used which lost their vigour during storage for the last treatments during experiment 4 and all treatments during experiments 5 and 6. From end of August onwards, a new batch of formulated spores was used of which the majority of spore clusters showed fungal growth. No significant treatments effects were found when data were analysed for each experiment separately. For an overall analysis, experiments 1, 5 and 6 were excluded because viable formulated *C. cladosporioides* H39 was not available during experiment 1 and viability was low during these experiments 5 and 6. A significant reduction of the number of conidia cm⁻² was found for treatments with formulated *C. cladosporioides* H39 on both young and elder leaves (Table 2 E). On average, conidia production was reduced by 42 % on young and 38 % on elder leaves. Such a trend was found during the first 3 experiments conducted under low disease pressure as well as during the last 2 experiments conducted under extremely high disease pressure. The nonformulated spores of the isolate did not reduce conidiation of *V. inaequalis*. When the formulation of *C. cladosporioides* H39 was applied containing only a few or even no living conidia, during experiments 5 and 6, no trend was found that the formulation itself had any reducing effect on conidiation (Table 2 A).

Example 2 Orchard test 2007

Material and methods

Fungal inoculum

Cladosporium cladosporioides H39 was produced as in Example 1. The formulated product contained 2.0 x 10⁹ spores g⁻¹ with a viability of 20%. During the experiment, the batch of formulated H39 was stored at 4 °C in the

dark in plastic bags. Suspensions were made by adding the formulated granules to Tween water (0.01 %) and stirring without any further pre-treatments. The final concentration was 1×10^7 spores ml^{-1} , equivalent to 2×10^6 viable spores ml^{-1} .

- 5 Spores of *Cladosporium cladosporioides* R406 were produced in Petri dishes on oat meal agar (20 g oat meal, 15 g agar, 1000 ml tap water) at 20 °C with 12 hrs blacklight per day. After 2 weeks of incubation, spores were suspended in tap water containing 0.01% Tween 80 and added to the plates. The suspension was filtered through gauze (200 μm mesh) to remove mycelial cells and the
- 10 number of spores was counted using a haemocytometer. Spore yields were $8 - 30 \times 10^8$ spores per agar plate (90 mm diameter) with an average viability of 93%, ranging between 73 to 97% for suspensions prepared at different dates. Viability of spores in the suspensions applied to the field was always checked by spraying suspension on malt extract agar (1 g malt extract, 15 g agar 1000
- 15 ml tap water, amended with tetracycline at 15 mg l^{-1} and streptomycine at 100 mg l^{-1}) in the orchard and assessing the percentage of germinated spores after incubation at 18°C for 24 h.

Orchard

- 20 The experiment was carried out in 3 rows of var. Jonagold within an organically managed orchard at Randwijk, the Netherlands. The aim of the experiment was to control the summer epidemic of *Venturia inaequalis* (Vi) by antagonist applications starting end of June. Therefore it was essential to allow an initiation of a mild to moderate epidemic in the orchards during the
- 25 primary season. The timing of sulphur applications was foreseen in a way that primary infections by ascospores could occur but progression of the epidemic could be controlled. No applications of sulphur were planned later than end of May. Unusual weather conditions during the primary season of 2007 with a period of 4 weeks without any rain were very unfavourable for Vi ascospore
- 30 release and infection. After weather became more conducive after April, a mild

2A

apple scab epidemic developed until beginning of the experiment. No sulphur treatments were carried out to reduce the progression of the epidemic.

Experimental design, treatments and assessments

- 5 The experiment was carried out in a design with 6 blocks, with 2 blocks in each of the 3 tree rows. Each block consisted of 4 plots, each with 4 trees. Between plots, 2 untreated trees served as buffer. The different treatments were randomly allocated to such plots. It was planned to spray the 4 trees of each plot at a rate of 2 l per plot twice per week with the following treatments: (1)
- 10 tap water amended with Tween 30 (0.01 %) as control; (2) suspension of formulated H39 (2×10^6 spores ml^{-1}); (3) suspension of formulated R406 (2×10^6 spores ml^{-1}). Applications were carried out twice per week at 16 dates between 28 June and 20 August using a hand-held sprayer operating with compressed air (AZO, Edecon, Ede, The Netherlands) with a 2-m boom and one nozzle
- 15 (Birchmeier helico saphir 1.2, 2F-0.6; pressure 250 kPa). Since formulated spores of R406 were not available at the beginning of the experiment, treatment (3) was carried out with spores produced freshly in the laboratory for each application. Applications of R406 twice per week started with a delay at 12 July so that this fungus was applied only at 12 dates. Because no
- 20 sufficient spores could be produced, only selected and labelled twigs obtained multiple sprays instead of whole tree treatments.

Assessments

- Conidia production.* Conidia production was assessed on susceptible young
- 25 leaves developed during the course of the experiment at 3 sampling dates for leaves treated with Tween-water as control, or conidial suspensions of H39 and for 2 sampling dates for R406. Sampling dates were chosen so that sets of susceptible leaves present during a predicted infection period were sampled approximately 5 weeks after the infection period. The Mills table based on leaf
 - 30 wetness duration and temperature was used to predict infection periods. For

each sampling, the second youngest just unfolded leaf was labelled 1 to 3 days after a predicted infection period on a set of 3 twigs belonging to the same tree in each plot. After 5 weeks, the 2 leaves just unfolded at the date of labelling and the next 2 younger leaves, unfolded after labelling, were sampled resulting in a sample consisting of 12 leaves per plot. Leaf samples were put into 250-ml glass bottles. Within 2 h, 100 - 150 ml (depending on amount of leaves) of tap water with 0.01% Tween 80 was added and bottles were shaken with a flask shaker (Stuart Scientific SF1, UK) at 700 OCS min⁻¹ for 10 min. From the obtained suspensions, sub-samples of 6 ml were stored at -18 °C and the concentration of conidia of *Vi* was determined later for each suspension with the aid of a haemocytometer. The leaf surface of all leaves per sample was measured with an area meter (Li-COR Biosciences, model 3100, Lincoln, U.S.A.).

Sampling dates were 6 August (of leaves labelled at 2 July), 16 August (of leaves labelled at 12 July), and 20 August (of leaves labelled at 16 July).

Epiphytic and endophytic colonisation. Twenty labelled leaves of trees treated with Tween-water (control) or spore suspensions of H39 and of twigs treated with spore suspensions of R406 were collected at 4 October from each plot. All sampled leaves had been developed on the trees during the period between 28 June and 20 August when the series spray applications had been carried out. It thus can be assumed that all leaves obtained one or several spore applications at young developmental stages.

From each leaf, one leaf disc (9 mm diameter) was cut using a corkborer. The resulting 20 leaf discs per sample were pooled in sterile 50-ml vials containing 10 ml of sterile Tween-water (0.01 %) and vials were shaken using a flask shaker at high speed (700 OCS min⁻¹) for 10 min. From the resulting suspensions, serial dilutions (1:10) were prepared and 100 µl of undiluted and diluted suspensions were plated on each of 2 agar plates containing malt agar (10 g malt extract, 15 g agar, 1000 ml tap water) amended with 100 mg l⁻¹

streptomycine and 15 mg l⁻¹ tetracycline. Plates were incubated at 20 °C in the dark and colonies of *Cladosporium* spp., other hyphal fungi and yeasts were counted after 4, 7 and 11 days. From the colony counts, the number of colony forming units (CFU) cm⁻² leaf surface was calculated for each sample.

- 5 After shaking of the leaf disks to remove epiphytically present fungi, the pooled 20 leaf disks per sample were surface-sterilised and homogenated in 5 ml sterile water using a mortar. For surface sterilisation, leaf discs were dipped in 96 % ethanol followed by submersion for 1 minute in 0.5 % sodium hypochlorite and subsequently rinsed 3 times with sterile water. From the
- 10 resulting homogenates serial dilutions (1:10) were prepared in sterile water and 100 µl of undiluted and diluted suspensions were plated on each of 2 malt agar plates containing 100 mg l⁻¹ streptomycine and 15 mg l⁻¹ tetracycline. Plates were incubated and colonies of endophytic fungi were assessed as described above.

15

Statistics

- The number of *Vi* conidia produced per cm⁻² leaf surface was calculated per replicate sample. Natural logarithmic-transformed values of the control treatment were compared with the individual antagonist treatments
- 20 separately for both leaf ages by one-sided unprotected LSD-test ($\alpha = 0.05$). The logarithmic-transformed numbers of CFU per cm⁻² leaf surface were analysed by ANOVA followed by two-sided LSD-tests ($\alpha = 0.05$).

Results

- 25 Weather conditions during the period of the experiments with frequent rainfalls and moderate temperatures were very favourable for apple scab. At the beginning of the experiments only light symptoms were present in the orchards. At the end heavy scab symptoms were observed on leaves of trees within the experimental plots and in the neighbourhood.

Spores of R406 produced freshly for each application date had high germination rates, generally above 80% (Table 3). Formulated spores of H39 germinated for 20 – 30 % during the first weeks of the experiment but germination dropped to 4 - 16 % for the last 4 treatments. The exceptional high value for spore germination of 76 % at the first spraying date can be explained by experimental variation due to the small sample size of only 1 plate sprayed under orchard conditions.

On leaves sampled at 6 August, 16 August and 20 August from water-treated trees, 77,200 (13,900 to 139,300), 45,300 (35,200 to 55,200) and 32,200 (8,800 to 111,800) conidia cm^{-2} were produced on average (backtransformed means, range for 6 replicates in brackets; Fig. 2). Variation between replicates thus was considerably high. On leaves of trees treated with H39, the number of spores was statistically significantly lower with 24,200 conidia cm^{-2} (69 % reduction) at the first sampling date and 22,000 conidia cm^{-2} (51 % reduction) at the second sampling date. For the last sampling date, no treatment effect was observed for H39. For the sampling dates when leaves treated with R406 were available, conidia counts at 16 August were 24,300 conidia cm^{-2} for leaves treated with R406 resulting in a statistically significant reduction of conidia by 46 %. For 20 August, only a reduction by 15 % was observed and counts did not differ from the control treatment.

No treatment effects on leaf development or symptoms of phytotoxicity were observed.

Close to leaf fall, the endo- and epiphyticol colonisation of leaves was assessed by plating leaf washings and homogenates of surface sterilised leaves on agar and counting of colony forming units (CFU). The endophytic colonisation by *Cladosporium* spp. was significantly higher and epiphyticol colonisation by *Cladosporium* spp. tended to be higher for leaves which had been treated with H39 during summer. The endo- and epiphyticol colonisation of H39-treated leaves by other hyphal fungi tended to be lower compared to untreated leaves.

Epiphyticol colonisation by yeasts was significantly lower for H39-treated leaves.

Example 3 Field test 2005/2006

5

Materials and Methods

Experimental design and treatments

In autumn of 2005, 25 fungal isolates belonging to different species including
10 *Cladosporium cladosporioides* R406 were applied on apple leaves from an organically managed orchard in Randwijk, the Netherlands, and treated leaves were placed on the orchard floor until next spring. The selection of candidates was based on the results of the pre-screening carried out on economical feasibility and possible risks (see example 1). Spores of isolate R406 were
15 produced on oat meal agar (28 days incubation at 18°C). Spore suspensions (500 ml per isolate) were prepared by flooding cultures on agar with sterile water containing 0.01% Tween 80. After gently rubbing with a rubber spatula to remove spores from fungal cultures, suspensions were filtered through sterile nylon gauze with a mesh of 200 µm. Concentrations of suspensions were
20 determined with the help of a haemocytometer and adjusted to 2x10⁶ spores ml⁻¹. Spray applications were carried out using hand held sprayers operating with pressed air. Leaves of extension shoots were collected from the trees at 17 October to carry out the spray applications under controlled conditions in a glasshouse compartment. During the period between picking the leaves and
25 fixing leaves in nettings again on the orchard floor, leaves were stored at 5 °C. Leaves were fixed in nettings, each with 40 randomly chosen leaves, at 18 and 19 October. At 20 October 4 nettings with leaves per replicate of each treatment were sprayed with spore suspensions or water with approximately 20 ml of the suspensions (or water in the control treatments) at both sides.
30 Two of the nettings, each containing 40 leaves, were destined for determination of the potential ascospore production of *V. inaequalis*, the other two nettings for determination of *V. inaequalis* population densities by

TaqMan-PCR. After applications, leaves were dry again within approximately 30 min. Nettings with treated leaves were fixed on the orchard floor at 21 October on bare soil within the organic orchard at Randwijk. There were 6 blocks (replicates) in different rows of the orchard.

- 5 Each spore suspension was also sprayed on an agar plate (1/10 malt agar). Plates were incubated at 18°C for 2 days and germination rate was determined. Spores of R406 had a viability of >90%.

Assessments

- 10 At 23, 24, 25, 30 and 31 January 2006, respectively the nettings of the replicates 1 to 6 destined for the quantification of the *V. inaequalis* population densities by TaqMan-PCR were collected in the orchard, carefully rinsed with tap water to remove adhering soil and allowed to dry overnight at room temperature. Leaf residues of the 2 nettings per replicate of each treatment
- 15 were removed from the nettings, cut in 1- to 2-cm pieces and a sample of 5–10 g was freeze dried and subsequently pulverized in a laboratory mill with a 1-mm mash sieve. Powdered samples were stored at -18°C. DNA was extracted and DNA of *V. inaequalis* was quantified by species-specific realtime PCR (TaqMan-PCR).
- 20 At 20 March (block A), 22 March (block B), 27 March (block C), 29 March (block D), 3 April (block E), and 5 April (block F), the nettings were collected in the orchard to quantify the potential ascospore production after ascospore extraction by bubbling air in water. Leaf residues of the 2 nettings per replicate of each treatment were air-dried (20°C, 70% RH, 2 days) and weight
- 25 was determined. Subsequently, a sub-sample of maximum 7-17 g air-dried leaf residues of each sample was spread in a plastic tray on moist filter paper. Trays were covered by a plastic bag and leaf residues were incubated in these moist chambers for 7 days at 20°C in the dark followed by 14 days at 20 °C with 12 h light per day to allow maturation (of a substantial fraction) of asci.

Different climate rooms were used for incubation but leaves belonging to the same block were always incubated in the same room.

After incubation, leaf residues were transferred into 1000 ml-plastic bottles containing 150-350 ml water depending on the amount of leaf residues. Air (250 l per h) was bubbled through the water resulting in heavy turbulence during 2 h. Thereafter, the resulting suspension was passed through a sieve (1 mm mesh) to remove leaf debris. Two sub-samples (8 ml) of the suspension were stored at -20 °C. Ascospore concentration in the suspensions was determined microscopically using a haemocytometer. Ascospore production was expressed as production per 80 leaves (originally fixed on the orchard floor in autumn) or per g air-dried leaf residue present at sampling date in spring. The ascospore production per 80 leaves is a result of the possible effect of the treatment on the decomposition and the ascospore production.

Statistics

Data obtained for ascospore numbers were logarithmic-transformed ($\log_{10}$). All data were analysed by ANOVA. Means of the control treatments and the individual antagonist treatments were compared using LSD-tests ($\alpha = 0.05$). Since P-values of ANOVAs often were greater than $P = 0.05$, no further multiple comparisons between antagonist treatments were made.

Results

The amount of DNA of *V. inaequalis* was quantified in leaf residues sampled end of January 2006 by realtime PCR (TaqMan-PCR) using a species-specific primer pair and probe. The total amount of *V. inaequalis*-DNA in the total residues left from 80 leaves was calculated. Residues of leaves treated by *Cladosporium cladosporioides* R406 had significantly less *V. inaequalis*-DNA compared to the untreated control (Table 6).

The number of ascospores produced on leaves in spring was high with on average 7.5×10^5 (back-transformed values) for the residues of 80 leaves from

the control treatment (Table 7). Per g leaf residue, 3.4×10^4 ascospores were produced in the control treatment (Table 8). For residues of leaves treated with isolate *Cladosporium cladosporioides* R406 ascospore counts were approximately 70 % lower. These differences between control treatment and treatment with R406 were statistically significantly for both the number of ascospores produced on the residues of 30 leaves and the number of ascospores produced per g of leaf residue (Tables 7 & 3). No other treatment with different candidate antagonists tended to cause a reduction of ascospores.

10 **Example 4 Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on conidia production of *Venturia inaequalis* under orchard conditions**

Objective

Applications of conidia of the antagonist *C. cladosporioides* H39, pilot-formulated as water dispersible granule (WG), reduced the conidia production of the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* under orchard conditions in experiments carried out in 2006 and 2007 conditions (see Example 1 and 2). The objective of the experiment carried out in 2008 was to confirm these results in another season and to obtain first insight in the best timing of antagonist applications after predicted infection periods for *V. inaequalis*.

Production of conidia of H39

For applications in the orchard, conidia of *C. cladosporioides* H39 were produced in a Solid - State Fermentation (SSF) system by PROPHYTA Biologischer Pflanzenschutz GmbH, Germany. The harvested conidia were formulated as a water dispersible granule (WG). For the preservation of product quality, the final product was stored at 4 °C. Viability of dried conidia was determined on malt extract agar (1 g malt extract l⁻¹) before the beginning of the field experiment. Conidia incubated for 24 hours at 20 °C with germ tubes longer than half of the minimum diameter of a conidium were considered to be viable.

Orchard assay

The experiment was carried out in the organically managed orchard at Applied Plant Research, Randwijk, The Netherlands on 8 years-old trees cv Jonagold.

- 5 The aim of the experiment was to control the summer epidemic of apple scab by antagonist applications. Therefore it was essential to allow an initiation of an epidemic in the orchard during the primary season. Weather conditions during the primary season of 2008 favoured scab development and many scab symptoms were found in the orchard beginning of June. A severe hail event
- 10 seriously damaged the orchard at June 22. At June 24 and 26, Topsin-M (a.i. 500 g thiophanate methyl l⁻¹, Certis Europe B.V., Maarsen, The Netherlands) was applied at of rate of 140 ml per 100 litre water (applied at 1000 l ha⁻¹) in the entire orchard and the neighbouring orchards to prevent wound infections by European fruit tree canker (*Nectria galligena*). No further fungicide
- 15 treatments were carried out to reduce the progression of the scab epidemic before or during the experiment. During the following weeks, trees produced abundant new shoots with new leaves. Such newly formed leaves, not damaged by hail or reached by the fungicide sprays, were used in the experiment.
- 20 The experiment was arranged in a design with 6 blocks, with 2 blocks in the same tree row. Each block consisted of 3 plots, each with 4 trees. Between plots, 2 untreated trees served as buffer. The following 3 different treatments were randomly allocated to the plots: (1) untreated as control; (2) conidial suspension of formulated H39 (2 x 10⁶ viable conidia ml⁻¹; 2 l per plot). The
- 25 spray additive Trifolio S-forte (Trifolio-M GmbH, Lahnau, Germany) was added to the suspension at a rate of 2 ml l⁻¹ to improve the spray layer on the leaf surface. Biweekly applications of H39 were carried out at July 22, July 24, July 28, July 31, August 05, August 07, August 11, and August 13. (3) The third treatment consisted of weekly application of sulphur (Thiovit-Jet,
- 30 Syngenta Crop Protection E.V., Roosendaal, The Netherlands; a.i. 80 %

sulphur) at a rate of 0,4% (400 gram per 100 litre water at 1000 l ha⁻¹).

Sulphur treatments were applied at July 22, July 28, August 5, and August 11.

The number of scabbed leaves and the number of scab spots per leaf were
 5 assessed for the leaves of 10 shoots of each of the 4 trees per plot before the
 experiment started at June 11. In total 227 to 239 leaves were examined per
 plot. At September 19, scab symptoms were assessed on 177 to 232 leaves per
 plot which had been produced after the beginning of the experiment. Disease
 severity (% leaf surface covered with scab symptoms) was estimated using
 10 following classes: 1: No scab; 2: 1 – 10 % coverage; 3: 11 – 50 % coverage; and
 4: 51 – 100 % coverage. A severity index was calculated using the formula:

$$DS = (0 \times N_1 + 1 \times N_2 + 2 \times N_3 + 3 \times N_4) / N_{\text{total}} * 100$$

15 In which N_1 , N_2 , N_3 , and N_4 is the number of leaves grouped in the classes 1, 2,
 3, and 4, respectively, and N_{total} is the total number of leaves assessed per plot.

Conidia production of *V. inaequalis* was assessed on susceptible young leaves
 developed during the course of the experiment at 3 sampling dates. Sampling
 20 dates were chosen so that sets of susceptible leaves present during a predicted
 infection period were sampled approximately 5 weeks after the infection
 period. The Mills table based on leaf wetness duration and temperature was
 used to predict infection periods. The second youngest just unfolded leaf was
 labelled 1 to 3 days after a predicted infection period on a set of 3 twigs
 25 belonging to the same tree in each plot. The period between predicted infection
 infection and first application of *C. cladosporioides* H39 as well as the number
 of sprays and period of protection by sprays differed per sampling date (Fig. 3).
 After 35 days, the 2 leaves just unfolded at the date of labelling and the next 2
 younger leaves, unfolded after labelling but expanded during the course of the
 30 experiment, were sampled resulting in a sample consisting of 12 leaves per
 plot. Sampling dates were August 22 (of leaves labelled on July 18), August 26

(of leaves labelled on July 22), and September 04 (of leaves labelled on August 01). The 12 leaves per sampled were pooled and put into 250-ml glass bottles. Within 2 h, 100 - 150 ml (depending on leaf mass) of tap water with 0.01% Tween 80 was added and bottles were shaken with a flask shaker at 700 OCS min⁻¹ for 10 min. From the obtained suspensions, sub-samples of 6 ml were stored at -18 °C. The concentration of conidia of *V. inaequalis* was determined for each suspension with the aid of a haemocytometer. The leaf surface of all leaves per sample was measured with an area meter.

10 **Results and discussion**

Conidia of *C. cladosporioides* H39 produced in spring 2008, formulated as a water dispersible granule following the pilot protocol and stored at 5°C had a viability of 65 % at the beginning of the experiments. Viability remained stable until the end of the experiment.

15 Before the experiment started, scab incidence on leaves did not differ for plots belonging to the different treatments. The mean incidence was 81.7 % in plots used as control, 84.6 % for plots later treated with H39, and 84.3 % for plots later treated with sulphur. Also the number of leaf spots per leaf did not differ statistically, so that it can be assumed that the scab development was similar
20 in the different plots before the experiment started.

On leaves sampled on August 22, August 26 and September 04 from untreated trees 35,242 (11,447 to 74,870), 30,242 (18,926 to 59,497) and 32,533 (19,698 to 46,350) conidia of *V. inaequalis* • cm⁻² leaf surface were produced on average (backtransformed means, range for 6 replicates in brackets) (Fig. 4). On leaves
25 of trees treated with *C. cladosporioides* H39, the number of spores was statistically significantly lower with 11,499 conidia of *V. inaequalis* • cm⁻² leaf surface (67 % reduction based on backtransformed values) on the first sampling date and 15,139 conidia • cm⁻² leaf surface (50 % reduction) on the second sampling date. For the last sampling date, no significant effect was
30 observed for applications of *C. cladosporioides* H39 with 21,163 conidia • cm⁻²

leaf surface (35 % reduction) on treated leaves. Applications of sulphur resulted in a reduction of the number of conidia of *V. inaequalis* produced per cm² leaf surface by 2, 16, and 26 % for the different sampling dates (Fig. 4). Scab severity, assessed at September 19, one month after the last treatment with H39, was 2.2 for the control treatment, but statistically significantly lower with 1.8 for H39-treated plots (Fig. 5). In sulphur treated plots, scab severity was 2.0 which did not differ significantly from the other treatments.

During the orchard experiment environmental conditions resulted in a high number of infection periods and scab development was favoured. Also the exceptional development of new shoots after the hail event supported the summer epidemic. Under such a severe disease pressure treatments with sulphur often are not sufficient to achieve disease control as also found in our experiment. Treatments with the antagonist H39 reduced conidia production of *V. inaequalis* under such severe conditions, confirming results from orchard experiments carried out in 2006 and 2007. The strongest effect was found for the first sampling date when treatments with H39 started after the predicted infection but were continued until 4 days before sampling. For the third sampling date, multiple treatments with H39 had been carried out already before the predicted infection period but the last treatment had been applied 17 days before sampling. In this situation, conidia production of *V. inaequalis* was reduced only by 35 %. Since the effect of the antagonist may also depend on environmental factors which differed before the different sampling dates, more data are needed from repeated orchard experiments before conclusions on optimum timing of antagonist applications can be drawn.

For the first time also scab severity has been assessed after treatments with the antagonist H39. The reduced scab severity at the high scab level observed in the orchard demonstrated that *C. cladosporioides* H39 has a high potential to control scab epidemics.

Example 5. Orchard assay in 2007/2008: Effect of treatments with *Cladosporium cladosporioides* H39 and R406 during summer on ascospore production of *Venturia inaequalis* on treated leaves after overwintering

5

Objective

Treatments of apple leaves during summer with conidial suspensions of the antagonists *Cladosporium cladosporioides* H39 and R406 led to the reduction of conidia production of the scab fungus *Venturia inaequalis* on treated apple leaves under orchard conditions (see Example 1 and 2). Objective of an additional assessment made on leaves treated in the orchard during the experiment in 2007 was to study the effect of such treatments of young developing leaves with the antagonists during summer on the ascospore production by *V. inaequalis* in treated leaves after overwintering.

15

Experimental design. The experiment was carried out in the organically managed orchard at Applied Plant Research, Randwijk, The Netherlands. The aim of the experiment was to assess the potential of antagonist applications to control the summer epidemic of apple scab and to reduce the inoculum load of *V. inaequalis* produced in overwintering apple leaves. Therefore it was essential to allow an initiation of a mild to moderate epidemic in the orchard during the primary season. Unusual weather conditions during the primary season of 2007 with a period of 4 weeks without any rain were very unfavourable for *V. inaequalis* ascospore release and infection. Weather became more conducive after April and a mild apple scab epidemic had developed when the first antagonist suspension was applied. No fungicide treatments were carried out to reduce the progression of the epidemic before or during the experiment.

The experiment was carried out on 8 year-old trees cv Jonagold in a design with 6 blocks, with 2 blocks in the same tree row. Each block consisted of 3

30

plots, each with 4 trees. Between plots, 2 untreated trees served as buffer. The 3 different treatments were randomly allocated to the plots. Trees were treated at a rate of 2 l per plot twice per week with the following treatments: (1) tap water amended with Tween 30 (0.01 %) as control; and (2) conidial suspension of formulated H39 (2×10^6 conidia ml^{-1}). Applications were carried out twice per week at 16 dates between 23th June and 20th August. (3) The third treatment consisted of multiple spray applications of conidial suspensions of *C. cladosporioides* R406. Conidia freshly produced at each application date were applied twice per week on the 4 trees of each replicate plot at 12 dates between 12th July and 20th August.

Conidia production of *V. inaequalis* during summer. The effect of treatments on the conidia production of *V. inaequalis* has been reported as Example 2.

15

Ascospore production of *V. inaequalis* in overwintering apple leaves.

On 12th July 2007 the second youngest just unfolded leaf was labelled on 25 twigs per plot. In some plots fewer twigs were available. On 4th October 2007, leaves were sampled which had been just unfolded at the date of labelling and the next 2 younger leaves, unfolded after labelling. Depending on availability of leaves at the sampling date, 16 to 65 leaves per plot were collected. Sampled leaves of each plot were weighted and fixed between 2 iron nettings sized 50 x 50 cm (15 x 20 mm mesh) so that leaves did not touch each other. Nettings with leaves were placed on the orchard floor on bare soil within apple rows of the organic orchard at Randwijk and fixed with metal nails so that most of the netting surface touched the soil. There were 6 blocks (replicates) and nettings containing leaves from different treatments (applied during summer) were randomly distributed within blocks.

On 26th February 2008, nettings were collected. Leaf residues of both nettings per replicate were pooled, air-dried (20°C, 70% RH, 2 days) and weighted.

41

Subsequently, the air-dried leaf residues of each sample were spread in separate plastic trays (50 x 30 x 6 cm) on moist filter paper. Trays were covered by a plastic bag and leaf residues were incubated in these moist chambers for 7 days at 20°C in the dark followed by 14 days at 20 °C with 12 h
5 light (75 µE) per day to allow maturation (of a substantial fraction) of asci. After incubation, leaf residues were transferred into 1000 ml-plastic bottles containing 150-350 ml water depending on the amount of leaf residues. Air (250 l h⁻¹) was bubbled through the water resulting in heavy turbulence during 2 h (Heye *et al.* 1981, Canadian Journal of Botany 59, 965-968; Philion, 1995,
10 Msc Thesis McGill University, Montreal, Canada). Thereafter, the resulting suspension was passed through a sieve (1 mm mesh) to remove leaf debris. Two sub-samples (3 ml) of the suspension were stored at -20 °C. Ascospore concentration in the suspensions was determined microscopically using a haemocytometer. Ascospore production was expressed as production per g
15 leaves (originally fixed on the orchard floor in autumn) or per g air-dried leaf residue present at sampling date in spring.

Results and discussion

On leaf residues from the control treatment, 220,089 ascospores were produced
20 per g leaf residue (dry weight). This was equivalent to 37,171 ascospores produced per g leaf tissue (fresh weight) present in the preceding autumn (Table 9). In residues from leaves which had been treated with *C. cladosporioides* H39 in the preceding summer, only 109,044 ascospores were produced, equivalent to 15,733 ascospores produced per g leaf tissue (fresh
25 weight) present in the preceding autumn. This reduction of ascospore production by 53% respectively 50% compared to the control treatment was statistically significant. The effect of *C. cladosporioides* R406 on ascospore production in spring after treatment of apple leaves during the preceding summer was less pronounced and not statistically significant.

It can be concluded that summer treatments of orchards during summer with the antagonist *C. cladosporioides* H39 and possibly also with *C. cladosporioides* R406 have a long-lasting effect in the following spring on the production of ascospores by *V. inaequalis*. A reduced number of ascospores produced on overwintering leaves will result in a lower inoculum pressure during the primary infection season of apple scab and thus a slower development of scab at the beginning of the epidemic. To our knowledge this is the first report demonstrating that treatments of young developing apple leaves, highly susceptible to scab, with an antagonist results in a significantly lower ascospore production on the treated leaves in the next season after overwintering.

Example 6 Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on spore production of various pathogens

Objective

The objective of subsequent experiments was to evaluate the effect of the antagonist on various other plant pathogens.

Materials and Methods

Conidia of *Cladosporium cladosporioides* H39. Conidia of *Cladosporium cladosporioides* H39 were produced in a Solid - State Fermentation (SSF) system by PROPHYTA Biologischer Pflanzenschutz GmbH, Germany. The harvested conidia were formulated as a water dispersible granule (WG). For preservation of the product quality, the final product was stored at -20 °C. Viability of dried conidia was determined on malt extract agar (1 g malt extract l⁻¹) before the beginning of the experiments. Conidia incubated for 24 hours at 20 °C with germ tubes longer than half of the minimum diameter of a conidium were considered to be viable. Sixty five per cent of the conidia were viable.

Pathogens. The following pathogen isolates were used in the study (with growth medium used for spore production in brackets): *Nectria galligena* 780 (oat meal agar; OA) causing canker in fruit trees and fruit rot, *Stemphylium* 5 *versicarium* 850 (oat meal agar, OA) causing Brown Spot Disease and fruit rot in pear, *Botrytis aclada* 008 (OA) causing onion neck rot, *Botrytis cinerea* 143 (OA) causing grey mould in various crops, *Mycosphaerella fijiensis* 78 (potato dextrose agar; PDA), causing Black Sigatoka in banana, *Fusarium* 10 *graminearum* 820 (PDA) causing Fusarium Head Blight in cereals, *Fusarium culmorum* 807 (PDA) causing Fusarium Head Blight in cereals, and *Alternaria brassicicola* 177 (PDA) causing diseases in *Brassicaceae*. All fungi were incubated for 14 days at 24°C with 12 hrs blacklight per day. To obtain spore suspensions, cultures were flooded with sterile tap water containing 0.01% Tween 80. After gently rubbing with a rubber spatula to 15 remove spores from fungal cultures, suspensions were filtered through sterile nylon gauze with a mesh of 200 µm. Concentrations of spore suspensions were determined with the aid of a haemocytometer and adjusted with sterile tap water containing 0.01% (v/v) Tween 80 to 1×10^2 spores ml⁻¹ and 1×10^3 spores ml⁻¹. For experiments with *Mycosphaerella fijiensis* also mycelial fragments, 20 obtained after sterile grinding of the mycelial mass, were included in the suspensions. Only mycelial fragments with more than three cells were considered when the concentration of the suspensions was adjusted.

Experimental design. Separate experiments were carried out for each 25 pathogen and substrate type and each experiment was repeated. Symptomless green leaves of pear, onion, rose, cyclamen, *Pelargonium*, banana and white cabbage were removed from greenhouse- or field-grown plants, and detached leaves were dried for several days at room temperature. Dry leaves were cut into segments each sized approximately 2 x 2 cm long, sealed in 30 plastic bags and sterilised by gamma radiation of 40 kGy. Four-cm long

segments of wheat straw (with 1 node) and of apple twigs (with 1 branch) were processed in the same way.

Segments of leaves, straw or twigs for use in bioassays were washed with sterile tap water to remove soluble nutrients. Therefore, approximately 30

5 segments of each substrate type were put in 150-ml aliquots of sterile tap water contained in sterile 250 ml-conical flasks over night at 4°C. Thereafter, segments were blotted dry with sterile filter paper. Four segments were placed in each of a series of moist chambers. Each chamber consisted of a sterile plastic petri dish (90 mm diameter) containing two sterile filter papers (85 mm
10 diameter) and 6 ml sterile tap water. In each experiment five replications (petri dishes) for treatments with the antagonist *Cladosporium cladosporioides* H39 and five replications for the water control were applied at each of the two levels of pathogen application (1×10^2 spores ml^{-1} and 1×10^3 spores ml^{-1}). During the experiment, petri dishes were arranged in a completely randomised
15 design.

Spore suspensions (or mycelial fragments in one case) of pathogens were sprayed on the segments of leaves, straw or twigs in the moist chambers.

Nectria galligena was applied on apple twig segments, *Stemphylium vesicarium* on leaf segments of pear, *Botrytis aclada* on onion leaf segments,
20 *Botrytis cinerea* on leaf segments of roses, cyclamen and *Pelargonium*, *Mycosphaella fijiensis* on leaf segments of banana, *F. graminearum* and *F. culmorum* on straw segments, and *Alternaria brassicicola* on leaf segments of white cabbage. Treated tissue segments were incubated at 24 °C for 18 hrs. Immediately after the first incubation period, spore suspensions of
25 *Cladosporium cladosporioides* H39 (2×10^6 vital spores ml^{-1}), or water, were sprayed on the segments. The pathogens and antagonists were applied with sterile atomisers at approximately 5 $\mu\text{l cm}^{-2}$ leaf segment. Thereafter, leaves were further incubated at 24 °C in the dark in the moist chambers. The straw segments with *F. graminearum* and *F. culmorum* were incubated from day 8 to

45

day 13 with 12 hrs per day blacklight. Twigs with *Nectria galligena* were incubated from day 12 to day 14 with 12 hrs per day blacklight

After a total incubation period of 9 days for *Botrytis aclada* and *Alternaria brassicicola* and 12 days for *Botrytis cinerea* (counted from the day on which

5 pathogens were applied), the surface area of leaf segments covered with conidiophores of *Botrytis aclada*, *Botrytis cinerea* or *Alternaria brassicicola* was estimated using classes from zero to five, that represented, respectively, 0%, 1 - 5%, >5 - 25%, >25 - 50%, >50 - 75%, and >75 - 100% of the leaf surface covered with spore producing structures of the pathogens (Köhl et al. 1995,

10 European Journal of Plant Pathology 101, 627-637). In the case of *Stemphylium vesicarium*, no conidiophores were produced, but the perfect stage (*Pleospora allii*) produced abundant pseudothecia. The coverage of the leaf surface with pseudothecia was estimated 16 days after inoculation using the same classes as for the coverage with conidiophores. From the number of

15 leaf segments of each class (n_0 -5) a sporulation index (SI) ranging from zero to hundred was calculated for each replication (petri dish) consisting of four leaf segments ($SI = (0 \times n_0 + 5 \times n_1 + 25 \times n_2 + 50 \times n_3 + 75 \times n_4 + 100 \times n_5) / 4$). The number of colonies produced by *Mycosphaerella fijiensis* on banana leaf segments was counted after an incubation period of 15 days. The number of

20 conidia of *F. graminearum* and *F. culmorum* produced on straw segments after 13 days was counted using a microscope. Therefore, straw segments from each petri dish were placed in an Erlenmeyer flask (100 ml) containing 10 ml of a washing liquid (20 % ethanol in tap water containing 0.01 % Tween 80). Flasks were shaken on a reciprocal shaker for 10 min, and the concentration of

25 conidia in the suspensions was determined microscopically for *F. graminearum* and *F. culmorum* using a haemocytometer. The same method was used to quantify the number of conidia of *Nectria galligena* on apple twig segments after an incubation period of 14 days.

Statistics. Data were analysed separately for each experiment by ANOVA followed by LSD-tests. If antagonist treatment x pathogen concentration interactions were not significant, the mean antagonist treatment effect is analysed as main effect. Data of spore counts were log-transformed before
 5 analysis: $\log\text{-number of spores} = \log_{10}(\text{number of spores} + 0.01)$.

Results and Discussion

Nectria galligena. A strong antagonistic effect of *Cladosporium*
 10 *cladosporioides* H39 was found against *Nectria galligena* causing canker in fruit trees and fruit rot. In orchards, the pathogen survives and multiplies on infected wound areas (cankers) of twigs (McCracken et al., 2003, Plant Pathology 52, 553-566). The inoculum produced in the bioassays on such tissues under controlled conditions was reduced by the antagonist by more
 15 than 99% (Table 10).

The results show that *Cladosporium cladosporioides* H39 has a high potential for use in biocontrol of fruit tree canker which is besides scab the most important disease in apple and pear production. Applications of the antagonist have thus the potential to control both major diseases, scab as well as fruit
 20 tree canker, in the major pome fruit crops.

Stemphylium vesicarium. *Stemphylium vesicarium* is causing brown spot of pear in major pear production areas in Europe (Llorente & Montesinos, 2006). The major source of primary inoculum of the disease are overwintering necrotic pear leaves on which pseudothecia of the perfect stage (*Pleospora allii*)
 25 are produced.

Applications of *Cladosporium cladosporioides* H39 on necrotic leaves, pre-colonised by the pathogen, significantly reduced the formation of pseudothecia (estimated by assessment of leaf surface coverage by the fruiting bodies) in both experiments (Table 11). Biological control of brown spot by *Cladosporium*

cladosporioides H39 may thus be achieved by applications of the antagonist to the canopy or on the orchard floor after leaf fall.

Stemphylium vesicarium was applied at a concentration of 1×10^2 spores ml^{-1} and 1×10^3 spores ml^{-1} 18 hrs before H39 was applied with 2×10^6 spores ml^{-1} .

5 ¹ Mean of 5 replicates, each with 4 leaf segments; leaf surface coverage with pseudothecia was estimated.

² Significantly different from control treatment (LSD-test; $\alpha = 0.05$).

Botrytis spp. Presence of necrotic host tissues is a pre-requisite for epidemics of grey mould and other diseases caused by *Botrytis* spp. It has been
10 demonstrated that competitive exclusion of *Botrytis* spp. from necrotic host tissues can be exploited for biocontrol of *Botrytis* incited diseases (Köhl et al., 2003, BioControl 48, 349-359).

Cladosporium cladosporioides H39 significantly reduced sporulation of *Botrytis aclada* and *Botrytis cinerea* in bio-assays on tissues of all of the four
15 different hosts tested (Tables 12 - 15). The antagonist has thus a potential for biological control of *Botrytis* - incited diseases in various crops.

Mycosphaerella fijiensis. *Mycosphaerella fijiensis* is causing Black Sigatoka in banana (Arzanlou et al., 2007, Phytopathology 97, 1112-1118). The disease
20 is the major threat in banana production. Disease control at present depends on multiple fungicide applications. The pathogen survives and multiplies in necrotic lesions on leaves.

The results of the bio-assay on necrotic banana leaves show that the antagonist *Cladosporium cladosporioides* H39 has a promising potential for biological control of the disease. Although spores were not formed by the
25 pathogen under the experimental conditions, it clearly could be demonstrated that the antagonist is able to exclude the pathogen from substrate colonisation (Table 16).

Fusarium graminearum and Fusarium culmorum. *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* are causing Fusarium Head Blight in
30 cereals and maize. The disease is causing yield losses and, often more

important, severe quality losses due to formation of mycotoxins by the pathogens. Straw stubbles and other debris are the main inoculum source of the disease (Osborne & Stein, 2007, International Journal of Food Microbiology 119, 103-108).

- 5 *Cladosporium cladosporioides* H39 significantly reduced conidia production of both *Fusarium* spp. on straw segments pre-colonised by the pathogens (Table 17 and 18) and thus has the potential for use in biocontrol of these major pathogens in cereal production.

- Alternaria brassicicola*.** Black leaf spot caused by *Alternaria brassicicola* is
10 a major disease of *Brassicaceae* in vegetable production. The pathogen sporulates within infected necrotic lesions and crops debris (Humpherson-Jones, 1989, Annals of Applied Biology 115, 45-50). Besides leaves, also whole seedlings as well as pods including developing seeds in seed production fields can be damaged.

- 15 A strong significant reduction of the conidia production of *Alternaria brassicicola* was found in the bio-assays after application of *Cladosporium cladosporioides* H39 to pre-colonised necrotic leaves of white cabbage (Table 19).

- 20 **Example 7. Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on fruit rot of apple**

Objective

- 25 The objective of a subsequent experiment was to evaluate the effect of the antagonist on *Monilia fructigena* causing post-harvest fruit rot on apple.

Material and Methods

- Conidia of Cladosporium cladosporioides* H39.** Conidia of *Cladosporium*
30 *cladosporioides* H39 were produced as in Example 6.

- Pathogen.** *Monilia fructigena* 1067, causing fruit rot in various fruit crops, was grown on oat meal agar for 14 days at 24°C with 12 hrs blacklight per day. To obtain spore suspensions, cultures were flooded with sterile tap water
- 5 containing 0.01% Tween 80. After gently rubbing with a rubber spatula to remove spores from fungal cultures, suspensions were filtered through sterile nylon gauze with a mesh of 200 µm. Since sporulation was poor, also mycelial fragments, obtained after sterile grinding of the mycelial mass, were included in the suspensions. Only mycelial fragments with more than three cells were
- 10 considered when the concentration of the suspensions was determined with the aid of a haemocytometer and adjusted with sterile tap water containing 0.01% (v/v) Tween 80 to 1×10^2 spores and mycelial fragments ml⁻¹ and 1×10^3 spores and mycelial fragments ml⁻¹.
- 15 **Experimental design.** Symptomless organically produced apples cv. Elstar were used in the bio-assays. Apples were surface-sterilised by submerging in 70% ethanol for 1 min and rinsed three-times in sterile tap-water. Four apples were placed into moist chambers (sized 23 x 15 x 9 cm; with moistened filter paper on bottom; enclosed by a lid) and two wounds (approximately 3 mm in
- 20 diameter and 5 mm deep) were made using sterile cocktail pickers (Jijakli & Lepoivre, 1992, In: Folkhema, N.J., J. Köhl & Y. Elad, Biological control of foliar and post-harvest diseases, IOEC/WPRS Bulletin Vol. 16(11), pp. 106-110.). Fifty µl of sterile water were applied to wounds of the control
- treatments. In another treatment, 50 µl of a conidial suspension of
- 25 *Cladosporium cladosporioides* H39 (2×10^6 vital spores ml⁻¹) were added to each wound. Treated apples were incubated at 24°C for 24 hrs. Subsequently, apples were treated with suspensions of spores and mycelial fragments of
- Monilia fructigena* at 1×10^2 and 1×10^3 spores and mycelial fragments and were further incubated in the moist chambers at 24 °C. Each treatment was
- 30 carried out in 5 replicates, each replicate consisting of 4 apples in the same

50

moist chamber, and moist chambers with various treatments were arranged in a completely randomised design. The experiment was repeated twice. The diameter of lesions developed from the inoculated wounds was measured 8 and 12 days after application of *Monilia fructigena*.

5

Results and Discussion

Monilia fructigena caused severe fruit rot on wounds of apple fruits under the experimental conditions, e.g. lesions were produced in the control treatment of both experiments on all wounds at the high pathogen level. Application of conidia of *Cladosporium cladosporioides* H39 reduced the number of infected wounds in most cases (Table 20a). The average lesion size was reduced by antagonist treatments by up to 70% (Table 20b). On average, fruit rot (measured as lesion size) was statistically significantly reduced by 50% in the first experiment, and by 30% in the second experiment.

10

The results demonstrate that applications of *Cladosporium cladosporioides* H39 during the growing season have the potential to protect apple fruits from pre-harvest and post-harvest fruit rot caused by *Monilia fructigena*. Also post-harvest treatments with *Cladosporium cladosporioides* H39 are promising to protect fruit from post-harvest rot during storage.

15

20

version 28 April 2006

Table 1. Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on conidia production of *Venturia inaequalis* on apple seedlings under controlled conditions. In total, 63 fungal isolates were tested in 14 experiments. Only results of the promising isolate are presented.

Treatment	Number of conidia cm ⁻² °									
	Experiment									
	1 (n=8) ^b	3 (n=9)	9 (n=10)	10 (n=10)	11 (n=10)	13 (n=10)	14 (n=11)			
Number of treatments	8	9	10	10	10	10	11			
Youngest leaves										
Control	1339	4915	1960	2393	4188	728	1480			
<i>C. cladosporioides</i> H39	-	-	-	-	863* (79)	330 (55)	572 (61)			
Elder leaves										
Control	-	-	331	359	1313	144	614			
<i>C. cladosporioides</i> H39	-	-	-	-	354* (73)	116 (19)	162* (74)			

5 ° Backtransformed values; efficacy relative to control treatment in brackets.
10 ^b Total number of treatments.
 ^c Statistically different from the control treatment.
 ^d Not tested.
 In experiments 1 and 3, the 4 youngest leaves per seedling were pooled; in the other experiments, the youngest leaf was sampled separately from the 3 next eldest leaves.

52

Table 2A Effect of applications of *Phoma pinodella* H3, *Coniothyrium cereale* H33, *Cladosporium* sp. H35 and *Cladosporium cladosporioides* H39 on conidia production of *Venturia inaequalis* under orchard conditions. Experiments 1, 5, and 6.

Treatment	Ln-Number of conidia cm ⁻²				
	Experiment				Mean
	1	5	6		
Youngest leaves					
Control	9.5 (12.8)	10.1 (24.9)	9.8 (18.0)		9.8 (18.0)
C. cladosporioides H39	9.1 (8.6)	10.7 (46.1)	10.7 (42.5)		10.2 (26.9)
C. cladosporioides H39 formulated, low viability	-	10.4 (32.4)	10.4 (31.8)		10.4 (32.9)
Elder leaves					
Control	9.2 (9.5)	9.2 (9.6)	9.3 (10.4)		9.2 (9.9)
C. cladosporioides H39	9.5 (12.9)	10.2 (26.1)	9.7 (16.1)		9.8 (18.0)
C. cladosporioides H39 formulated, low viability	-	9.3 (11.0)	9.7 (16.1)		9.5 (13.3)

5 ° Backtransformed values x 1000 in brackets.

Table 2. B Effect of applications of *Phoma pinodella* H3, *Coniothyrium cereale* H33, *Cladosporium* sp. H35 and *Cladosporium cladosporioides* H39 on conidia production of *Venturia inaequalis* under orchard conditions. Experiments 2, 3, 4, 7, and 8.

Treatment	Ln- Number of conidia cm ⁻² ^a											
	Experiment											
	2	3	4	7	8	Mean						
Youngest leaves												
Control	8.2	(3.6)	7.6	(2.1)	10.7	(46.3)	11.8	(132.1)	12.3	(227.3)	10.1	(25.3)
C. cladosporioides H39	8.9	(6.9)	7.9	(2.7)	10.2	(25.8)	12.4	(253.8)	12.1	(183.8)	10.3	(29.5)
C. cladosporioides H39 formulated	7.4	(1.6)	6.9	(0.9)	10.4	(31.7)	11.4	(90.4)	11.9	(147.2)	9.6*	(14.6)
Elder leaves												
Control	10.6	(40.3)	9.2	(12.3)	9.2	(9.8)	11.2	(72.8)	11.8	(132.1)	10.4	(33.0)
C. cladosporioides H39	10.5	(35.3)	8.9	(7.5)	8.7	(5.8)	11.4	(93.4)	11.9	(145.7)	10.3	(27.6)
C. cladosporioides H39 formulated	10.0	(21.3)	8.6	(5.5)	8.8	(6.6)	10.9	(52.3)	11.4	(90.7)	9.9*	(20.5)

5 ^a Backtransformed values x 1000 in brackets.
^b Statistically different from the control treatment

54

Table 3. Application dates and spore germination of applied inocula of H39 and R406 (as estimated from counting from 1 agar plate sprayed in the orchard).

Date of application	Spore germination (%)	
	H39	R406
28 June	76	-
2 July	26	-
5 July	47	-
9 July	-	-
12 July	28	96
16 July	32	97
19 July	28	95
23 July	19	97
26 July	26	94
30 July	23	96
2 August	16	97
6 August	11	90
9 August	4	96
13 August	4	95
16 August	10	95
20 August	4	73

5

Table 4. Epiphytial colonisation of apple leaves sampled at 4 October 2007. Leaves had been treated twice per week from 23 June until 20 August with H39 and V301.61 (16 applications in total) or from 12 July until 20 August with R406 (12 applications in total).

10

Treatment	Number of CFU cm ⁻² leaf surface (backtransformed)		
	<i>Cladosporium</i> spp.	Hyphal fungi different from <i>Cladosporium</i> spp.	Yeasts
Control	1005	1285	397 a ¹
H39	2223	1042	152 b
R406	502	400	100 b
	(F _{prob} =0.076)	(F _{prob} =0.069)	

¹ Values of the same column with common letters do not differ statistically significantly (LSD; α = 0.05).

5 Table 5. Endophytical colonisation of apple leaves sampled at 4 October 2007. Leaves had been treated twice per week from 28 June until 20 August with H39 and V801.61 (16 applications in total) or from 12 July until 20 August with R406 (12 applications in total).

Treatment	Number of CFU cm ⁻² leaf surface (backtransformed)		
	<i>Cladosporium</i> spp.	Hyphal fungi different from <i>Cladosporium</i> spp.	Yeasts
Control	1.19 b ¹	4.97	1.95
H39	1.66 a	2.72	3.75
R406	1.20 b	2.93	1.99
		(F _{prob} =0.182)	(F _{prob} =0.171)

10 ¹ Values of the same column with common letters do not differ statistically significantly (LSD; α = 0.05).

15 Table 6. Effect of spray applications of antagonist R406 on apple leaves in autumn 2005 on content of DNA of *V. inaequalis* in spring as determined by species-specific real-time PCR (TaqMan-PCR). Leaf residues were sampled on 23 to 31 January 2006.

Treatment	pg DNA of <i>V. inaequalis</i>	
	per mg dry weight of leaf residues	in residues of 30 leaves
Control	372	10093
R406	226	5007 * ¹

20 ¹ Statistically significantly different from the control treatment (LSD_{5%} = 5057).

56

Table 7. Effect of spray applications of antagonist R406 on apple leaves in autumn 2005 on *V. inaequalis* ascospore production on leaf residues of 80 leaves in spring 2006.

Treatment	Number of ascospores per 80 leaves		
	Log ₁₀ -transformed	Back-transformed	Relative to control ¹
Control	5.88	749894	100
R406	5.37 * ²	235505	31

- 5
- ¹ At back-transformed scale.
² Statistically significantly different from the control treatment (LSD_{5%} = 0.3604).

Table 3. Effect of spray applications of antagonist R406 on apple leaves in autumn 2005 on *V. inaequalis* ascospore production per gram of leaf residues in spring 2006.

Treatment	Number of ascospores per g leaf residue		
	Log ₁₀ -transformed	Back-transformed	Relative to control ¹
Control	4.54	34316	100
R406	4.07 * ²	11722	34

- 10
- ¹ At back-transformed scale.
² Statistically significantly different from the control treatment (LSD_{5%} = 0.3183).
- 15

87

5 Table 9. Effect of treatments of young leaves with *Cladosporium cladosporioides* H39 and R406 carried out during summer between June 23 and August 20 on ascospore production of *Venturia inaequalis* in treated leaves after overwintering on the orchard floor. Orchard experiment 2007/2008.

Treatment	Log-Number of ascospores g ⁻¹ of			
	original leaf sample (fresh weight)		leaf residues in spring (dry weight)	
Control	4.57	(37,171) °	5.34	(220,089)
H39	4.20	* b (15,733)	5.04	* (109,044)
R406	4.52	(32,991)	5.32	(211,203)

° Backtransformed values.
b Significantly different from control treatment (one-sided LSD-test; α = 0.05).

10

Table 10. Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on sporulation of *Nectria galligena* on apple twig segments incubated in moist chamber at 24°C for 14 days.

	Log-number of conidia per straw segment ¹					
Treatment	1x10 ² spores ml ⁻¹		1x10 ³ spores ml ⁻¹		Mean	
Experiment 1						
Water control	6.64	(4,365,200)	6.56	(3,630,800)	6.60	(3,981,100)
H39	3.76	(5,800)	3.06	(1,100)	3.41 * 2	(2,600)
Experiment 2						
Water control	6.59	(3,881,500)	6.75	(562,300)	6.67	(4,666,600)
H39	4.32	(20,900)	4.44	(27,200)	4.38 *	(23,800)

15

Nectria galligena was applied at a concentration of 1•10² spores ml⁻¹ and 1•10³ spores ml⁻¹ 18 hrs before H39 was applied with 2x10⁶ spores •ml⁻¹.
¹ Mean of 5 replicates, each with 4 twig segments; backtransformed values in brackets.

20

² Significantly different from control treatment (LSD-test; α = 0.05).

Table 11. Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on sporulation of *Pleospora allii* (*Stemphylium vesicarium*) on necrotic pear leaves incubated in moist chamber at 24°C for 16 days.

Treatment	Sporulation index of <i>Pleospora allii</i> ¹		
	1x10 ² spores ml ⁻¹	1x10 ³ spores ml ⁻¹	Mean
Experiment 1			
Water control	29.5	36.8	33.1
H39	8.2	26.8	17.5 * ²
Experiment 2			
Water control	49.0	48.8	48.9
H39	11.5	18.2	14.9 * ²

5

Table 12. Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on sporulation of *Botrytis aclada* on necrotic onion leaves incubated in moist chamber at 24°C for 9 days.

10

Treatment	Sporulation index of <i>Botrytis aclada</i> ¹		
	1x10 ² spores ml ⁻¹	1x10 ³ spores ml ⁻¹	Mean
Experiment 1			
Water control	93.8	98.8	96.2
H39	10.0	12.0	11.0 * ²
Experiment 2			
Water control	92.5	83.0	87.8
H39	8.8	18.0	13.4 *

Botrytis aclada was applied at a concentration of 1x10² spores ml⁻¹ and 1x10³ spores ml⁻¹ 18 hrs before H39 was applied with 2x10⁶ spores ml⁻¹.

¹ Mean of 5 replicates, each with 4 leaf segments.

² Significantly different from control treatment (LSD-test; α = 0.05).

15

Table 13. Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on sporulation of *Botrytis cinerea* on necrotic rose leaves incubated in moist chamber at 24°C for 12 days.

Treatment	Sporulation index of <i>Botrytis cinerea</i> ¹		
	1x10 ² spores ml ⁻¹	1x10 ³ spores ml ⁻¹	Mean
Experiment 1			
Water control	76.2	85.0	80.6
H39	17.5	43.0	30.2 * ²
Experiment 2			
Water control	61.5	96.2	78.9
H39	35.8	85.0	60.4 *

5 *Botrytis cinerea* was applied at a concentration of 1x10² spores ml⁻¹ and 1x10³ spores ml⁻¹ 18 hrs before H39 was applied with 2x10⁶ spores ml⁻¹.
1 Mean of 5 replicates, each with 4 leaf segments.
2 Significantly different from control treatment (LSD-test; α = 0.05).

10 Table 14. Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on sporulation of *Botrytis cinerea* on necrotic cyclamen leaves incubated in moist chamber at 24°C for 12 days.

Treatment	Sporulation index of <i>Botrytis cinerea</i> ¹	
	1x10 ² spores ml ⁻¹	1x10 ³ spores ml ⁻¹
Experiment 1		
Water control	95.0	95.0
H39	28.2 * ²	66.5 *
Experiment 2		
Water control	95.0	90.0
H39	57.8 *	95.5

15 *Botrytis cinerea* was applied at a concentration of 1x10² spores ml⁻¹ and 1x10³ spores ml⁻¹ 18 hrs before H39 was applied with 2x10⁶ spores ml⁻¹.
1 Mean of 5 replicates, each with 4 leaf segments.
2 Significantly different from control treatment (LSD-test; α = 0.05).

Table 15. Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on sporulation of *Botrytis cinerea* on necrotic *Pelargonium* leaves incubated in moist chamber at 24°C for 12 days.

Treatment	Sporulation index of <i>Botrytis cinerea</i> ¹		
	1x10 ² spores ml ⁻¹	1x10 ³ spores ml ⁻¹	Mean
Experiment 1			
Water control	34.8	42.0	38.4
H39	1.5	8.5	5.0 * ²
Experiment 2			
Water control	24.5	23.2	23.9
H39	0.2	11.0	5.6 *

5 *Botrytis cinerea* was applied at a concentration of 1x10² spores ml⁻¹ and 1x10³ spores ml⁻¹ 18 hrs before H39 was applied with 2x10⁶ spores ml⁻¹.
1 Mean of 5 replicates, each with 4 leaf segments.
2 Significantly different from control treatment (LSD-test; α = 0.05).

10 Table 16. Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on sporulation of *Mycosphaerella fijiensis* on necrotic banana leaves incubated in moist chamber at 24°C for 15 days.

Treatment	Number of colonies of <i>Mycosphaerella fijiensis</i> per leaf segment ¹
Experiment 1	
Water control	5.65
H39	0.15 * ²
Experiment 2	
Water control	10.15
H39	0.00 *

15 *Mycosphaerella fijiensis* was applied at a concentration of 1x10³ mycelial fragments ml⁻¹ 18 hrs before H39 was applied with 2x10⁶ spores ml⁻¹.
1 Mean of 5 replicates, each with 4 leaf segments.
2 Significantly different from control treatment (LSD-test; α = 0.05).

Table 17. Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on sporulation of *Fusarium graminearum* on wheat straw incubated in moist chamber at 24°C for 13 days.

	Log-number of conidia per straw segment ¹			
Treatment	1x10 ² spores ml ⁻¹		1x10 ³ spores ml ⁻¹	
Experiment 1				
Water control	5.615	(412,100)	5.731	(538,300)
H39	4.759 * ²	(57,400)	5.501	(317,000)
Experiment 2				
Water control	5.872	(744,700)	5.885	(767,400)
H39	5.416 *	(260,600)	5.670 *	(467,700)

5

Fusarium graminearum was applied at a concentration of 1x10² spores ml⁻¹ and 1x10³ spores ml⁻¹ 18 hrs before H39 was applied with 2x10⁶ spores ml⁻¹.

¹ Mean of 5 replicates, each with 4 straw segments; backtransformed values in brackets.

² Significantly different from control treatment (LSD-test; α = 0.05).

10

62

Table 13. Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on sporulation of *Fusarium culmorum* on wheat straw incubated in moist chamber at 24°C for 13 days.

Treatment	Log-number of conidia per straw segment ¹					
	1x10 ² spores ml ⁻¹		1x10 ³ spores ml ⁻¹		Mean	
Experiment 1						
Water control	6.496	(3,133,290)	6.614	(4,111,500)	6.555	(3,589,200)
H39	6.092	(1,235,900)	6.390	(2,454,700)	6.241 * ²	(1,741,800)
Experiment 2						
Water control	6.446	(2,792,500)	6.521	(3,313,900)	6.484	(3,047,900)
H39	6.222	(1,667,200)	6.413	(2,588,200)	6.317 *	(2,074,900)

5 *Fusarium culmorum* was applied at a concentration of 1x10² spores ml⁻¹ and 1x10³ spores ml⁻¹ 18 hrs before H39 was applied with 2x10⁶ spores ml⁻¹.
1 Mean of 5 replicates, each with 4 straw segments; backtransformed values in brackets.
10 2 Significantly different from control treatment (LSD-test; α = 0.05).

Table 19. Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on sporulation of *Alternaria brassicicola* on necrotic white cabbage leaves incubated in moist chamber at 24°C for 9 days.

Treatment	Sporulation index of <i>Alternaria brassicicola</i> ¹		
	1x10 ² spores ml ⁻¹	1x10 ³ spores ml ⁻¹	Mean
Experiment 1			
Water control	72.5	80.0	76.2
H39	2.5	23.2	12.9 * ²
Experiment 2			
Water control	73.8	87.5	
H39	11.5 *	41.8 *	

5 *Alternaria brassicicola* was applied at a concentration of 1x10² spores ml⁻¹ and 1x10³ spores ml⁻¹ 18 hrs before H39 was applied with 2x10⁶ spores ml⁻¹.
1 Mean of 5 replicates, each with 4 leaf segments.
2 Significantly different from control treatment (LSD-test; α = 0.05).

Table 20. Effect of *Cladosporium cladosporioides* H39 on fruit rot caused by *Monilia fructigena* on apples cv Elstar incubated in moist chamber at 24°C for 8 and 12 days.

5 a. Number of lesions produced per 8 wounds.

Treatment	Number of lesions ¹		
	1x10 ² spores ml ⁻¹	1x10 ³ spores ml ⁻¹	Mean
Day 8			
Water control	4.8	8.0	6.4
H39	1.8	6.6	4.2 * ²
Day 12			
Water control	8.0	6.4	7.2
H39	7.4	5.4	6.4

b. Average lesion diameter.

10

Treatment	Lesion diameter (mm) ¹		
	1x10 ² spores ml ⁻¹	1x10 ³ spores ml ⁻¹	Mean
Day 8			
Water control	19.0	43.1	31.1
H39	5.6	24.7	15.2 * ²
Day 12			
Water control	53.3	85.7	69.5
H39	31.1	66.2	48.6 *

Cladosporium cladosporioides H39 was applied to wounds using 50 µl spore suspension at 2x10⁶ spores ml⁻¹. After 24 hrs, *Monilia fructigena* were applied using 50 µl suspension at 1x10² spores and mycelial fragments ml⁻¹ and 1x10³ spores and mycelial fragments ml⁻¹.

15

¹ Mean of 5 replicates, each with 4 apples with 2 treated wounds per apple.
² Significantly different from control treatment (LSD-test; α = 0.05).

65

Claims

1. *Cladosporium cladosporioides* H39, as deposited on 13 December 2007 under number CBS 122244 with the Centraal Bureau Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.
2. *Cladosporium cladosporioides* R406, as deposited on 13 December 5 2007 under number CBS 122243 with the Centraal Bureau Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.
3. Composition to control a plant pathogen of leaves, fruits and ears, comprising a *Cladosporium* according to claim 1 or 2.
4. Composition according to claim 3, wherein said plant pathogen is 10 selected from the group consisting of apple scab (*Venturia inaequalis*), pear scab (*Venturia pirina*), leaf spot (*Elumeriella jaxpi*), rose black spot (*Diplocarpon rosae* / *Marssonina rosae*), brown spot (*Stemphylium vesicarium*), powdery mildew (*Podosphaera leucotricha* / *Sphaerotheca pannosa*), begonia 15 mildew (*Microsphaera begoniae*), strawberry powdery mildew (*Sphaerotheca macularis*), sooty blotch (*Gloeodes pomigena*), fly speck (*Zygophiala jamaicensis*), peach leaf curl (*Taphrina deformans*), brown rot/spur canker (*Monilia fructigena*, *M. laxa*), pear rust (*Gymnosporangium sabinae* / *G. fuscum*), canker 20 (*Nectria galligena*), rose black spot (*Diplocarpon rosae*), rust on roses (*Phragmidium tuberculatum* / *Phragmidium spp.*), *Botrytis* spp. in various plants, *Mycosphaerella brassicicola* in cabbage, *Mycosphaerella fijiensis* in banana, *Alternaria* spp. in *Brassica*, potato and various other plants, *Fusarium* spp. especially in 25 cereals including maize, *Phytophthora infestans* of potato and *Plasmopara viticola* in grapevine, preferably wherein said fungal foliar pathogen is apple scab.

5. A composition according to claim 3 or 4, wherein the *Cladosporium* is present as spores.
6. A composition according to claim 5, which further comprises a carrier for the *Cladosporium* spores, preferably wherein said carrier is glucose.
7. Composition to control a plant pathogen of leaves, fruits and ears, wherein an extract of a *Cladosporium* according to claim 1 or 2 is present.
8. A method to control a pathogen in plants, comprising treating said plants with a composition according to any of claims 3-7.
9. A method according to claim 8, wherein said composition is sprayed on the leaves, fruits or ears of the plant.
10. A method according to any of claims 8-9, wherein control of the pathogen comprises prevention of infection and/or a decrease of plant damage caused by said pathogen.
11. A method according to any of claims 8-10, wherein said pathogen is selected from the group consisting of apple scab (*Venturia inaequalis*), pear scab (*Venturia pirina*), leaf spot (*Blumeriella jaapi*), rose black spot (*Diplocarpon rosae* / *Marssonina rosae*), brown spot (*Stemphylium vesicarium*), powdery mildew (*Podosphaera leucotricha* / *Sphaerotheca pannosa*), begonia mildew (*Microsphaera begoniae*), strawberry powdery mildew (*Sphaerotheca macularis*), sooty blotch (*Gloeodes pomigena*), fly speck (*Zygophiala jamaicensis*), peach leaf curl (*Taphrina deformans*), brown rot/spur canker (*Monilia fructigena*, *M. laxa*), pear rust (*Gymnosporangium sabinae* / *G. fuscum*), canker (*Nectria galligena*), rose black spot (*Diplocarpon rosae*), rust on roses (*Phragmidium tuberculatum* / *Phragmidium* spp.), *Botrytis* spp. in various plants, *Mycosphaerella brassicicola* in cabbage, *Mycosphaerella fijiensis* in banana, *Alternaria* spp. in *Brassica*,

LA

potato and various other plants, *Fusarium* spp. especially in cereals including maize, *Phytophthora infestans* of potato and *Plasmopara viticola* in grapevine, preferably wherein said fungal foliar pathogen is apple scab.

- 5 12. A method according to any of claims 8-11, wherein said composition is applied pre-harvest.
13. A method according to any of claims 8-11, wherein said composition is applied post-harvest.
- 10 14. Use of a *Cladosporium* according to claim 1 or 2, or a composition according to any of claims 3-7 for the prevention or treatment of infection of leaves, fruits or ears of a plant by a pathogen.
15. A *Cladosporium* strain according to claim 1 or 2, or a composition according to any of claims 3-7 for use in the control of a plant pathogen infection.

Figure 1 A



B

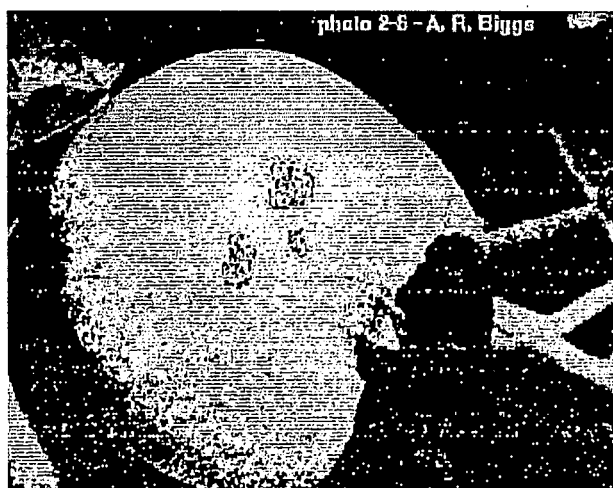


Figure 2

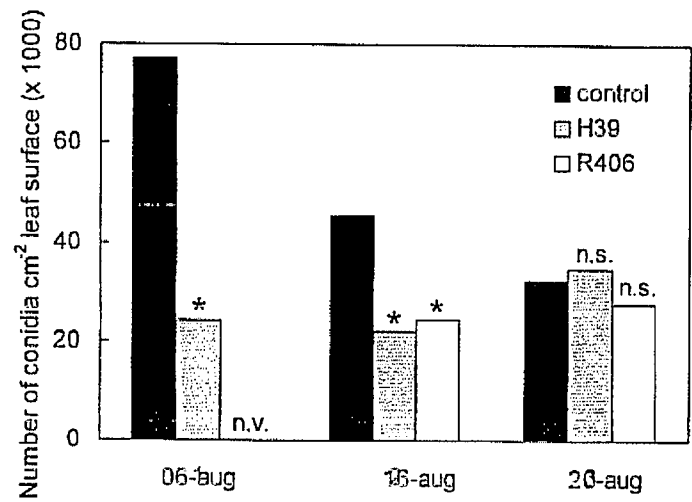
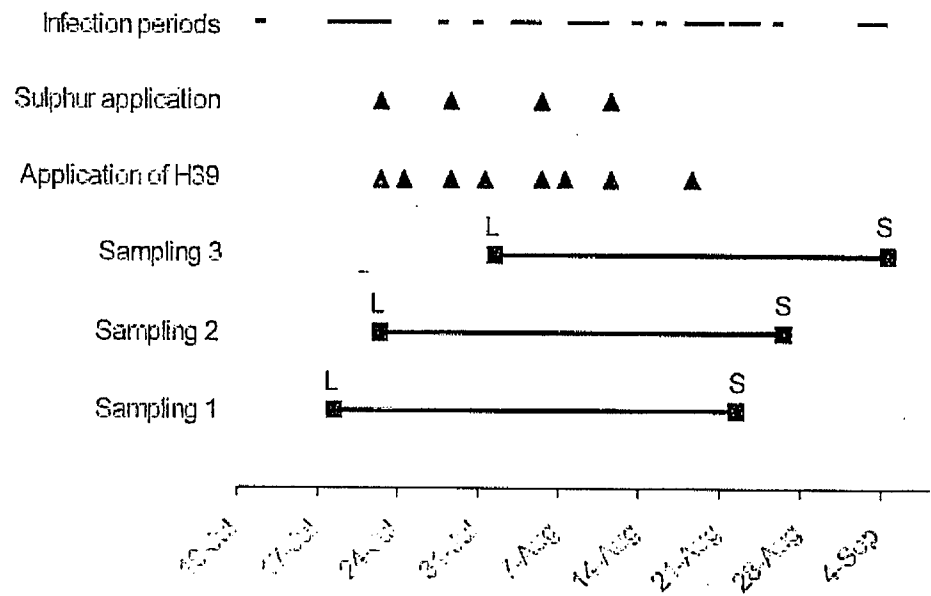
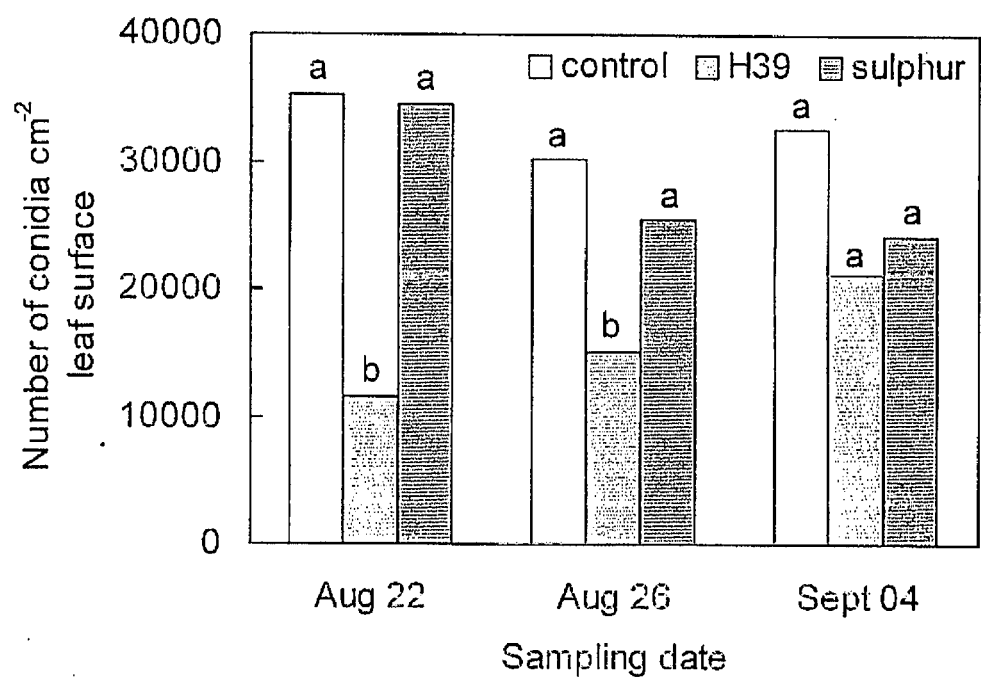


Figure 3



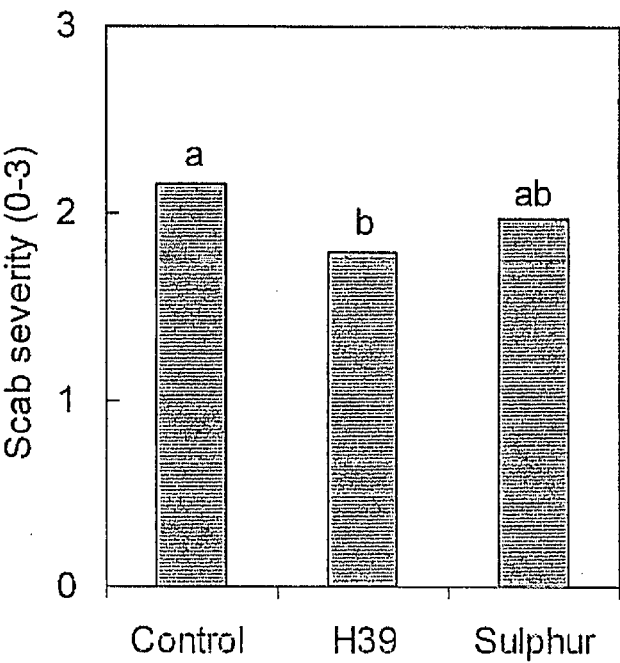
70

Figure 4



71

Figure 5



MICROORGANISMOS NOVEDOSOS QUE CONTROLAN PATÓGENOS EN PLANTAS

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con el campo del control de patógenos de plantas, particularmente en hojas, frutos o espigas, más específicamente en los cultivos de árboles frutales, tales como el manzano y en particular, con el control de la enfermedad fúngica foliar conocida como sarna del manzano (*Venturia inaequalis*).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La sarna del manzano tiene una gran importancia económica en las áreas donde se siembran los manzanos. Si no se controla, la enfermedad puede causar grandes pérdidas (del 70 por ciento o más) donde se presenta tiempo húmedo y frío durante los meses de la primavera. Las pérdidas son ocasionadas directamente por infecciones del fruto o del pedúnculo, o indirectamente por la defoliación repetida que puede reducir el crecimiento y producción del árbol.

La sarna del manzano (ver figura 1) puede ser observada en hojas, peciolo, flores, sépalos, frutos, pedicelos, y con menos frecuencia en los brotes y yemas jóvenes. Las primeras lesiones aparecen con frecuencia en el envés a medida que emergen y son expuestas a infecciones en la primavera. Más tarde, a medida que las hojas se abren ambas superficies son expuestas y se pueden infectar. Las lesiones jóvenes van de color marrón aterciopelado a verde oliva y tienen

márgenes indefinidos. Con el tiempo, los márgenes se vuelven definidos, pero pueden oscurecerse si varias lesiones se unen. A medida que una hoja infectada envejece, los tejidos adyacentes a la lesión se vuelven más gruesos y la superficie de la hoja se deforma. Las hojas jóvenes pueden enrollarse, disminuir en tamaño y deformarse cuando las infecciones son numerosas. Las lesiones pueden permanecer en la superficie superior e inferior de la hoja durante todo el tiempo de desarrollo de la planta; en ocasiones, las células subyacentes toman color marrón y mueren, de modo que las lesiones color marrón son visibles en ambas superficies. La cantidad de lesiones por hoja puede variar de una o dos hasta más de cien. El término "sheet scab" se usa por lo general para referirse a hojas con la superficie completa cubierta de sarna. Las hojas jóvenes con "sheet scab" a menudo se marchitan y caen del árbol. Las infecciones de los peciolo y pedúnculos tienen como resultado la abscisión prematura de las hojas y el fruto, respectivamente. A finales del verano o a comienzos del otoño pueden aparecer lesiones blanquecinas debido al crecimiento de un hongo secundario en la superficie de la lesión.

Las lesiones en los frutos jóvenes tienen una apariencia similar a las que aparecen en las hojas, pero a medida que el fruto infectado crece, las lesiones se vuelven corchosas y de color marrón. Las infecciones a principio de la estación pueden hacer que el fruto se desarrolle desigualmente a medida que las porciones no infectadas siguen creciendo. Luego pueden aparecer grietas en la cáscara y la pulpa o es posible que el fruto se deforme. Toda la superficie del fruto es susceptible de infección, pero las infecciones a principio de la estación se agrupan

24

por lo general alrededor del extremo del cáliz. Las infecciones que ocurren en los frutos a finales del verano o a principios del otoño pueden no ser visibles hasta que las frutas estén en almacenamiento. Este síntoma se conoce como "pin-point scab", con lesiones negras circulares rugosas que van de 0.004 a 0.16 pulgadas (0.1-4 mm) de diámetro.

Aunque investigaciones en Nueva York han demostrado que el hongo de la sarna del manzano puede sobrevivir el invierno en árboles como conidios en las yemas, el patógeno generalmente sobrevive el invierno en hojas y frutos en el piso del huerto. Las ascosporas son la principal fuente de inóculo primario y se producen dentro de los pseudotecios que se desarrollan en las hojas durante los meses del invierno. En un año típico en la mayoría de lugares, las primeras ascosporas maduras son capaces de causar infecciones cerca al momento de la brotación de yemas o poco tiempo después. Las ascosporas siguen madurando y son liberadas durante un periodo de cinco a nueve semanas, con un periodo de máxima descarga durante las etapas fenológica de caída de pétalos. El tiempo requerido para que la infección ocurra depende de la cantidad de horas de humedad continua en las hojas y de la temperatura durante el periodo húmedo. Las hojas jóvenes permanecen susceptibles durante un periodo de cinco a ocho días pero en los envases pueden ser infectados a finales del verano. En cuanto al fruto, la duración del periodo húmedo requerido para la infección se incrementa con la edad del fruto el cual continua susceptible hasta la cosecha. Una vez el hongo se establece en la hoja o en el fruto, se forman conidios en la superficie de la lesión y se convierten en la fuente de inóculo secundario durante lo que resta de la

25

estación. Los conidios se diseminan hacia las hojas y frutos en desarrollo debido a la lluvia y al viento. Pueden darse varios ciclos secundarios severos de infección por conidios durante el tiempo de desarrollo de la planta dependiendo de la frecuencia de los periodos de infección y la susceptibilidad del tejido hospedante.

El manejo de la sarna del manzano es variado, con cultivares resistentes, condiciones de salubridad y químicos que se utilizan hasta cierto punto dependiendo del sistema de huerto que se esté utilizando y de las metas del cultivador.

La mayoría de los principales cultivares de manzano son susceptibles al hongo, aunque esto varía de cierta forma. Se han obtenido más de 25 cultivares resistentes a la sarna del manzano, entre los que se incluyen Prima, Priscilla, Jonafree, Redfree, Liberty, Freedom, Goldrush, y Pristine. La mayoría están adaptados a las áreas de cultivo de manzanas más septentrionales de los Estados Unidos. Todos los cultivares resistentes a la sarna del manzano varían en su susceptibilidad a otras enfermedades de principio de temporada, y todos son susceptibles a las enfermedades del verano. Algunos cultivares obtenidos recientemente que no han sido producidos específicamente para que sean resistentes a la sarna también muestran diferentes niveles de susceptibilidad a sarna.

La prevención de la formación de pseudotecios en hojas de manzano que sobreviven el invierno probablemente eliminaría la sarna como una seria amenaza

76

para la producción de manzanas. Por desgracia, eliminar los pseudotecios por completo no es posible bajo las condiciones de huerto con los métodos actuales.

La sarna del manzano es controlada principalmente con rociadores de fungicida. Existe una gran variedad de rociadores de fungicida con distintos modos de acción. Cuándo y cómo se usen depende del modo de acción. Los fungicidas protectores evitan que las esporas germinen o penetren el tejido de la hoja. Para que sean efectivos, deben aplicarse a la superficie del tejido susceptible antes de que ocurra la infección. El momento en que ocurre la infección puede, entre otros, predecirse con un pronóstico acertado del tiempo. Los fungicidas protectores se aplican periódicamente a intervalos de 7 a 10 días o de acuerdo con los periodos de infección anticipados.

Los fungicidas post-infección controlan el hongo de la sarna dentro de las hojas y el fruto. Estos químicos pueden penetrar los tejidos de la planta para eliminar o inhibir el desarrollo de la lesión. La capacidad de estos fungicidas para detener las infecciones se limita a unas pocas horas, o a unos pocos días (dependiendo del fungicida específico), y su efecto a menudo varía de acuerdo con las temperaturas durante las primeras 24 a 48 horas después de la infección. Algunos fungicidas pueden inhibir el hongo incluso después del periodo de incubación (el tiempo entre la infección y la aparición de los síntomas). La erradicación de las lesiones de la sarna del manzano por lo general no ocurre después de que éstas aparecen, pero puede lograrse con tiempos de aplicación y cantidades correctas de ciertos fungicidas. La selección de fungicidas para el manejo de la sarna del manzano se

77

basa en factores diversos, entre los que se incluyen el espectro completo de otras enfermedades que deben ser manejadas en ese momento, el potencial de resistencia del hongo de la sarna del manzano al químico seleccionado, la historia de la enfermedad en un huerto en particular, el mercado final para el fruto y otros factores sociales y económicos. Las buenas prácticas de horticultura, tales como la selección de un sitio apropiado, la distancia entre árboles y la poda anual, facilitan un mejor control químico al mejorar el cubrimiento del rociador y reducir el tiempo de los periodos húmedos. Los fungicidas químicos usados en el tratamiento o prevención de la sarna del manzano incluyen maneb, mancozeb, captan, pirimetanil y tolifluanide.

Por consiguiente, aun existe la necesidad de un fungicida natural que sea efectivo para el control de la sarna del manzano, no dañe el medio ambiente y no sea tóxico para los seres humanos o animales.

RESUMEN DE LA INVENCION

Los inventores han encontrado dos nuevos aislados de *Cladosporium cladosporioides*, es decir *C. cladosporioides* H39, como se consignó el 13 de Diciembre de 2007 bajo el numero CBS 122244 con the Central Bureau Schimmelcultures, Baarn, Países bajos y *Cladosporium cladosporioides* R406, como se consignó el 13 de Diciembre de 2007 bajo el numero CBS 122243 con the Central Bureau Schimmelcultures, Baarn, Países bajos. Dichos aislados son útiles en una composición para controlar un fitopatógeno de hojas, frutos y espigas. Una composición de este tipo es útil preferiblemente para enfermedades

en las que dicho fitopatógeno es seleccionado del grupo que comprende la sarna del manzano (*Venturia inaequalis*), la roña o moteado de la pera (*Venturia pirina*), mancha de la hoja (*Elumeriella jaapi*), mancha negra del rosál (*Diplocarpon rosae*/ *Marssonina rosae*), la mancha marrón del peral (*Stemphylium vesicarium*) ,oídio del manzano (*Podosphaera leucotricha*/ *Sphaerotheca pannosa*), oídio de la begonia (*Microsphaera begoniae*),oídio de la fresa (*Sphaerotheca macularis*), enfermedad del hollín (*Gloeodes pomigena*),mancha de mosca (*Zygophiala jamaicensis*), lepra del melocotonero o abolladura (*Taphrina deformans*), pudrición marrón, cancro (*Monilla fructigena*, *M. laxa*),roya del peral (*Gymnosporangium sabinae*/ *G. fuscum*),chancro (*Nectria galligena*), mancha negra del rosál (*Diplocarpon rosae*), roya del rosál (*Phragmidium tuberculatum*/ *Phragmidium spp.*), *Botrytis spp.* en varias plantas, *Mycosphaerella brassicicola* en la col, *Mycosphaerella fijiensis* en el banano, *Alternaria spp.* En Brassica, papa y otras plantas, *Fusarium spp.* especialmente en cereales entre los que se incluye el maíz, *Phytophthora infestans* de la papa y *Plasmopara viticola* en la vid, más preferiblemente en la que dicho patógeno fúngico foliar sea la sarna del manzano.

Adicionalmente, en tal composición el *Cladosporium* está presente en forma de esporas y además comprende un portador para las esporas de *Cladosporium*, preferiblemente en las que dicho portador es glucosa. Como alternativa, la composición puede comprender un extracto del *Cladosporium* de la invención.

En otra realización, la invención comprende un método para controlar un patógeno en plantas, lo que incluye tratar dichas plantas con una composición según la

invención. Preferentemente, dicha composición es rociada sobre las hojas, frutos o espigas de la planta. Este método para el control del patógeno comprende la prevención de la infección y/o una disminución del daño causado a la planta por parte de dicho patógeno. Dicho método podrá usarse en contra de cualquier patógeno mencionado anteriormente, preferentemente en contra de la sarna del manzano. Una realización adicional en la presente invención es el uso de un aislado de *Cladosporium* según la invención, o una composición según la invención para la prevención o el tratamiento de infección de hojas, frutos o espigas de una planta por parte de un patógeno. La invención comprende además una cepa de *Cladosporium cladosporioides* o una composición según la invención para uso en el control de una infección de patógenos de plantas.

DESCRIPCION DE LAS IMAGENES

Figura 1. Síntomas de la sarna del manzano causados por *Venturia inaequalis* (Vi) en hojas(a) y frutos (b).

Figura 2. Producción de conidios de Vi en hojas de manzano tratadas dos veces por semana con *Cladosporium cladosporioides* H39 o R406 (aproximadamente 2×10^6 esporas viables ml^{-1}) en un huerto manejado orgánicamente. Randwijk 2007. Los efectos significativos desde el punto de vista estadístico de los tratamientos individuales en comparación con el tratamiento de control se indican mediante "" de modo separado por fecha de muestreo; prueba LSD desprotegida unilateral; ($\alpha=0.05$). N.s.: no hay diferencia significativa; n.v.: no hay valor.

Figura 3. Periodos de infección predichos, fechas de aplicaciones de *Cladosporium cladosporioides* H39 y azufre con rociador, y fechas de muestreo (L.: etiquetado de hojas nuevas); S.: muestreo).

Figura 4. Efecto de los tratamientos con conidios de *Cladosporium cladosporioides* H39 o azufre en la producción de conidios de *Venturia inaequalis*. Las barras de la misma fecha de muestreo con una letra común difieren de manera significativa (prueba LSD; $\alpha=0.05$).

Figura 5. Efecto de los tratamientos con conidios de *Cladosporium cladosporioides* o azufre en la gravedad de la sarna. Las barras con una letra común difieren de manera significativa (prueba LSD; $\alpha=0.05$).

DESCRIPCION DETALLADA

Como se detalló anteriormente, la sarna del manzano es una enfermedad que tiene un gran impacto económico para los cultivadores de manzanas. Esto ocurre especialmente con el control de la sarna del manzano por parte de los agricultores orgánicos, quienes prácticamente no cuentan con pesticidas químicos alternativos, especialmente ahora que algunos de los agentes que se usan comúnmente están siendo retirados de manera paulatina debido a los riesgos ambientales y a los riesgos de toxicidad general.

Se está buscando una alternativa en forma de extractos de plantas, ya que dichos extractos han sido descritos como posibles candidatos para tratar enfermedades

fúngicas y cumplirían con los requisitos para agricultura orgánica. Hace poco se documentó el uso de extractos de *Yucca* (WO 2007/139382).

Sin embargo, además de extractos de plantas, existen microorganismos en la naturaleza que son útiles en el control de patógenos de plantas. Especialmente muchos hongos son conocidos por su efecto biocida, como por ejemplo el *Penicillium* y *Trichoderma*. Más específicamente, también existen hongos que son especialmente útiles contra patógenos de plantas. También en el caso de la sarna del manzano se han descubierto hongos con esa característica, tales como *Chaetomium globosum* (bougrau, M.A. et al., 1987, Phytopathol. 77:1470-1475), *Microsphaeropsis ochracea* (Carisse, O. et al., 2000,Phytopathol. 90:31-37), *Ophiostoma* sp. y *Phoma* sp. (Quimet, A., et al., 1997, Can. J. Bot. 75:632-639). Se pueden encontrar visiones generales en Burr, T.J et al., 1996, Biol. Control 6:151-157 y Fiss, M. et al., 2003, Z. pflanzenkrankh. Pflanzenschutz, 110(6):513-523. Hace poco, se reveló (Ziedan,E.H.E., 2006, Res. J. Agric. & Biol. Sci. 2(6):262-267) que un aislado de *Cladosporium cladosporioides*, derivado de la filosfera de la vid, administrado junto con ácido benzoico fue efectivo en contra del mildiu de la vid causado por el hongo *Plasmopara viticola*. Se encontró además que aislados particulares de *Cladosporium cladosporioides* pueden ser usados en contra de las infecciones por *Botrytis* y *Fusarium* (Newhook, F.J.,1957, New Zealand Journal of Science and Technology 23: 23-54.Eden et al., 1996, Plant Pathol.45:276-284).

En la presente invención se ha descubierto que dos aislados de *Cladosporium cladosporioides* son efectivos en contra de enfermedades patogénicas foliares causadas por hongos, tales como la sarna del manzano. Estos dos aislados son *Cladosporium cladosporioides* H39 y *Cladosporium cladosporioides* R406, consignados el 13 de Diciembre de 2007 con the Centraal Bureau Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands bajo los números CBS 122244 y CBS 122243, respectivamente. Como lo muestra la sección de especificación del experimento, estos dos nuevos aislados tuvieron un claro efecto en el desarrollo de la sarna del manzano, mientras que otros aislados de *Cladosporium cladosporioides* no tuvieron ningún efecto.

El *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries pertenece al grupo de los *Fungi imperfecti* y su crecimiento se caracteriza por colonias de aproximadamente 3 cm de diámetro cuando son cultivadas durante siete días en papa-dextrosa agar a 20 °C. Las colonias de *Cladosporium cladosporioides* son difusas, de color verde oliváceo y terciopelo; por el contrario, en malta agar negro verduzco. Los conidióforos son macronematos y micronematos, a veces hasta 350 micras de longitud pero generalmente mucho más cortas, de 2 a 6 micras de espesor, de color marrón oliváceo pálido a medio, lisos u ocasionalmente verrugosos. Los ramoconidios están septados 0-1, hasta 30 μ de largo, de 2-5 μ de espesor, lisos o en ocasiones con verrugas diminutas. Los conidios se forman en cadenas de ramas largas, la mayoría 0-septadas, elipsoidales o limoniformes, de 3-11 x 2-5 (en su mayoría 3-7 x 2-4) μ , presentan color marrón oliváceo pálido, más

comúnmente lisos pero verrugosos en algunas cepas (Ellis, M.B., 2001, Dematiaceous Hyphomycetes).

Se ha reportado que uno de los metabolitos, la cladosporina, actúa como antifúngico. Esta cladosporina ha demostrado tener propiedades antibióticas (Scott, P.M. et al., 1971, J. Antibiotics 24:747-755). Sin embargo, como se discutió anteriormente, se encontró en nuestros experimentos que no todos los aislados de *Cladosporium cladosporioides* tuvieron un efecto inhibitorio en la infección de la sarna del manzano. Según parece, la cladosporina no es funcional en contra de *Venturia inaequalis*, o lo que es más probable, los aislados del hongo difieren en su fenotipo de secreción y expresión de cladosporina. Posiblemente, otros mecanismos de modo de acción estén involucrados en el antagonismo de H39 y R406 hacia *Venturia inaequalis* y otros patógenos de plantas.

Los *Cladosporium spp.* son colonizadores epifíticos comunes de la superficie de la hoja que a veces se encuentran en altas densidades (Dickinson, 1981). La colonización epifítica por *Cladosporium cladosporioides* también se reporta en hojas de manzano (Fiss et al, 2000) y frutos (Teixido et al., 1999) Dichas poblaciones epifíticas de *Cladosporium spp.* pueden contribuir al control biológico intrínseco que ocurre de manera natural. En este caso, el control biológico de conservación (Eilenberg et al., 2001) que protege dichas poblaciones beneficiosas evitando fungicidas con efectos secundarios en poblaciones no objetivo (Teixido et al., 1999; (Walter et al., 2007) o incluso estimulando de manera selectiva dichas poblaciones beneficiosas que ocurren naturalmente, por ejemplo mediante

84

aplicación de nutrientes específicos, podría contribuir a la prevención de la sarna del manzano.

Como lo muestran los ejemplos, los dos aislados de la presente invención mostraron un efecto claro en el control de la sarna del manzano. Además, se sostiene que no solo la sarna del manzano sino cualquier fitopatógeno fúngico de hojas, frutos o espigas puede ser controlado por dichos aislados. Dicho patógeno foliar fúngico es seleccionado del grupo que conforman la sarna del manzano (*Venturia inaequalis*), la roña o moteado de la pera (*Venturia pirina*), mancha de la hoja (*Blumeriella jaapi*), mancha negra del rosál (*Diplocarpon rosae*/' *Marssonina rosae*), la mancha marrón del peral (*Stemphylium vesicarium*) ,oidios de varias plantas como la fresa, el rosál y el manzano, enfermedad del hollín (*Gloeodes pomigena*),mancha de mosca (*Zygophiala jamaicensis*), lepra del melocotonero o abolladura (*Taphrina deformans*), pudrición marrón, cancro (*Monilla fructigena*, *M. laxa*),roya del peral (*Gymnosporangium sabinae*/'*G. fuscum*),chanero (*Nectria galligena*), mancha negra del rosál (*Diplocarpon rosae*), roya del rosál (*Phragmidium tuberculatum*/' *Phragmidium spp.*), *Botrytis spp.* en varias plantas, *Mycosphaerella brassicicola* en la col, *Mycosphaerella fijiensis* en el banano, *Alternaria spp.* en *Brassica*, papa y otras plantas, *Fusarium spp.* especialmente in cereales entre los que se incluye el maíz, *Phytophthora infestans* de la papa y *Plasmopara viticola* en la vid, más preferiblemente en la que dicho patógeno fúngico foliar sea la sarna del manzano.

85

Parece ser que en el caso del H39 que la manera de cultivar y la formulación del hongo tuvieron una marcada influencia en el efecto inhibitorio. Los conidios de *Cladosporium cladosporioides* H39 producidos en agar harina de avena no fueron efectivos bajo condiciones de huerto pero aquellos producidos en hojuelas de avena en un fermentador mostraron efectividad moderada de manera sistemática. Observaciones al microscopio mostraron que los conidios producidos en hojuelas de avena en un fermentador fueron más grandes que aquellos producidos en agar avena. Se ha demostrado el efecto del crecimiento medio en la calidad de las esporas de los antagonistas que da como resultado un mejor desempeño bajo condiciones de estrés ambiental para algunos otros hongos antipatógenos, por ejemplo, células de *Candida sake* producidas en medios modificados low-a w (Teixido et al.,1999). La colonización de las hojas de manzano por hongos introducidos depende de la biología de las especies introducidas (Kinkel et al., 1989). En su caso de estudio, poblaciones introducidas de *C. globosum* disminuyeron de manera significativa en pocos días en comparación con las poblaciones de *A. pullulans*. En los experimentos anteriores, las composiciones inhibitorias se ampliaron en un intervalo de 3 a 4 días para garantizar altos niveles de población en las hojas. Sin embargo, los primeros resultados en la dinámica de la población de *Cladosporium cladosporioides* indican que después de la aplicación de H39 dichas poblaciones aumentaron y que dichos efectos del tratamiento fueron encontrados incluso después de varias semanas (ver ejemplo 2).

La formulación del hongo es importante para la viabilidad de las esporas fúngicas contenidas en la composición que se le aplica a la planta. Por lo visto, una formulación en la que la glucosa se utiliza como portador para las esporas del *Cladosporium* tiene un mejor desempeño que el hongo no formulado.

Como alternativa, una composición antifúngica de la presente invención puede contener un extracto de uno o los dos aislados de *Cladosporium cladosporioides* de la invención. Se pueden obtener extractos de los dos aislados como se describe en la documentación para otros extractos de *Cladosporium*, y una persona con destreza en el arte puede obtenerlos fácilmente (ver por ejemplo, Ding, L. et al., 2008, Current Microbiol., 56:229-235).

Además, la composición puede contener compuestos adicionales que se usan comúnmente en soluciones de rociador, tales como preservativos, compuestos superficie activa, agentes humectantes, y similares. Asimismo, es posible incluir compuestos antifúngicos adicionales u organismos en la composición con el fin de mejorar el efecto inhibitorio. En tal caso, se pueden utilizar niveles inferiores de fungicidas químicos tradicionales, permitiendo así una reducción deseada en la cantidad de fungicidas. Como se analizó anteriormente, los fungicidas químicos reducen el crecimiento del hongo patógeno de la planta y de ese modo cuentan con una oportunidad prolongada para que el *Cladosporium* logre su efecto. Se propone, por lo tanto, que una combinación de los aislados de la presente invención con fungicidas químicos adecuados inhibirá de un modo coordinado el patógeno foliar fúngico yendo así más allá de una simple adición a los efectos

87

individuales. Asimismo, una combinación de los aislados de la invención con cualquier antagonista de patógeno foliar fúngico microbiano será útil en la presente invención.

Otra realización de la invención es un método para controlar un patógeno fúngico en las hojas, frutos y espigas que comprende tratar dichas plantas con una composición según la invención.

En dicho método, las plantas son rociadas con una composición según la invención antes o después de una infección con el patógeno foliar de la planta. Rociar antes de la infección será útil para prevenir una infección. Aunque, si las esporas de los aislados no son completamente viables, este rociado anafiláctico debe repetirse de manera regular. Si las esporas son suficientemente viables, el aislado de *Cladosporium* podrá crecer en la filosfera de la planta, dando así protección duradera ya que evita infecciones y reduce la esporulación del patógeno, haciendo, así, que la epidemia se haga más lenta. Además, el aislado de *Cladosporium cladosporioides* reducirá la producción tanto de ascosporas en las hojas de manzano que sobrevivan el invierno como de las esporas de otros patógenos de plantas en sus residuos lo que dará como resultado menor incidencia de la enfermedad en la siguiente estación.

Una vez ha ocurrido la infección, el rociado debe ejecutarse de manera regular con el fin de controlar la enfermedad de forma efectiva.

Se puede hacer un tratamiento con una composición según la invención tanto en precosecha, es decir, cuando los frutos aun están en la planta, como en

poscosecha. En la parte experimental se muestra que también el tratamiento poscosecha es efectivo para combatir infecciones fúngicas.

No obstante, otra realización de la invención es el uso de una cepa de *Cladosporium* según la invención, o una composición según la invención para la prevención o tratamiento de infección por patógeno foliar fúngico.

Otra realización de la presente invención es una cepa de *Cladosporium* como se identificó anteriormente, o una composición según la invención para uso en el control de una infección por patógeno foliar fúngico.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 In vitro y pruebas de campo 2006

Material y métodos

Recolección de candidatos antagonistas

En septiembre de 2004 se recogieron hojas de manzanas infectadas con la sarna del manzano en 216 sitios en los países bajos, Bélgica, y Alemania noroccidental y central. Los sitios de muestreo fueron registrados mediante GPS. La mayoría de las muestras, compuestas de 10-50 hojas, provinieron de viejos árboles estándar o huertos abandonados sin ningún manejo de cultivo. De cada muestra se incubaron hojas verdes con colonias esporulantes de *V. inaequalis* durante tres días a 20 °C en cámaras húmedas. Después de eso, se inspeccionaron visualmente colonias de *V. inaequalis* en aumento de 10 a 60 veces para desarrollo de hongos

diferentes a *V. inaequalis*. Los micelios de los hongos o esporas se aislaron de las partes aéreas de la colonia con una aguja estéril y fueron transferidos a agar de avena (20 g de harina de avena, 15 g de agar, 1000 ml de *agua del grifo*) y agar V8 (200 ml de jugo V8, 3 g de CaCO_3 , 20 g de agar, 1000 ml de *agua del grifo*), ambos contenían 100 mg l⁻¹ de estreptomycin y 15 mg l⁻¹ de tetraciclina. Se prepararon cultivos puros partir de las colonias en desarrollo.

Preselección de candidatos antagonistas

Se utilizó un rápido sistema de rendimiento total para un primer chequeo de candidatos antagonistas con respecto a los riesgos potenciales y viabilidad económica del desarrollo de un producto de biocontrol. Los hongos pertenecientes al género *Aspergillus*, *Penicillium* o *Fusarium* fueron descartados debido al potencial que tienen varias especies dentro estos géneros para producir micotoxinas. Los aislados restantes de hifas de hongos de fueron cultivados en cajas de Petri en agar avena durante 21 días a 18 °C y 12 horas por día en oscuridad; se cultivaron levaduras agar de levadura basal (10 g de peptona bacteriológica, 1 g de extracto de levadura, 20 g de glucosa, 20 g de agar, 1000 ml de agua de grifo) durante 5 días a 18 °C. Para cada aislado, se determinó la producción de esporas o células de levadura por lámina con ayuda de un hemocitómetro después de la preparación de las suspensiones usando agua del grifo esterilizada que contenía Tween 80 al 0.01%. Se descartaron los aislados que produjeron menos de 1×10^5 esporas o células de levadura por lámina. Diez μl

de las suspensiones fueron colocados en láminas en duplicado en celdas estériles de 16 mm de diámetro que contenían 1.5 ml agar de malta (1 g de extracto de malta, 15 g de agar, 1000 ml de agua del grifo). Se incubaron diferentes láminas con campos inoculados a 5, 18 y 36 °C en oscuridad durante 14 días. Una lámina adicional con celdas que contenían agar de malta ajustada a aproximadamente -10 y -7 MPa agregándole KCl_2 a 18 °C durante 14 días. Se inspeccionaron los campos en busca de crecimiento fúngico y se descartaron los hongos que producían colonias a 36 °C y aquellos que no produjeron colonias a 5 °C o a -10 o -7 MPa. Los aislados restantes se almacenaron en papa dextrosa agar (Oxoid, 39 g, 1000 ml de agua del grifo) a 4 °C hasta uso extra.

Producción de inóculos fúngicos

Los conidios del aislado monospórico MB363B de *V. inaequalis* obtenidos de Bengtsson, Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg C, Dinamarca fueron producidos siguiendo el método de Williams (1976). Botellas de Duran (500 ml) con 40 ml de caldo de papa dextrosa (24 g l^{-1}) y una mecha de queso de tamaño de 10x25 cm extendido en la superficie interna de la botella, la parte inferior tocando el medio fueron autoclavadas e inoculadas con 250 µl de una suspensión de fragmentos micélicos de *V. Inaequalis* preparados inundando un cultivo del hongo sembrado en agar de papa dextrosa con agua estéril y frotando suavemente con una espátula estéril de caucho. Las botellas inoculadas fueron incubadas a 18 °C en oscuridad. Durante los primeros 4 días, las botellas

fueron incubadas en posición horizontal de modo que la mayor parte de la mecha estuviese cubierta por el caldo.

Después de eso, se incubaron botellas en posición vertical. Las botellas fueron rodadas cuidadosamente a los días 2, 7 y 11 para distribuir el caldo con micelios en crecimiento por toda la superficie de la mecha. Luego de 14 días, el caldo nutriente fue decantado y se agregaron 200 ml de agua de grifo estéril y se agitaron las botellas manualmente durante varios minutos. La suspensión conidial resultante se filtró mediante gaza de nilón estéril con una malla de 200 μm y se centrifugó a 5800 g durante 30 min a 6°C. El granulo con conidios fue resuspendido en agua del grifo; se determinó la concentración conidial con la ayuda de un hemocitómetro y se ajustó a 5×10^5 esporas por ml^{-1} agregando agua del grifo estéril. Se almacenó la suspensión a -18°C hasta el momento de uso. El resultado fue aproximadamente 3×10^6 conidios por botella.

Para los experimentos de preselección, se sembraron los aislados candidatos de hongos en hifas en agar de harina de avena durante 28 días a 18 °C y 12 horas de oscuridad por día; se sembraron levaduras en agar de levadura basal durante 5 días a 18°C. Se prepararon suspensiones de esporas o células de levadura inundando cultivos con agua del grifo estéril que contenía Tween 80 al 0.01%, frotando suavemente con una espátula estéril de caucho y realizando una filtración a través de gaza de nilón estéril con una malla de 200 μm . Se determinaron las concentraciones de las suspensiones con la ayuda de un hemocitómetro y se

ajustaron las concentraciones a 1×10^6 esporas o célula por ml^{-1} agregando agua del grifo estéril que contenía Tween 80 al 0.01%.

Para aplicaciones en los huertos, los hongos fueron producidos de la misma manera pero las concentraciones fueron ajustadas a 2×10^6 esporas ml^{-1} a la menos 1. Conidios de dos aislados también fueron producidos en un fermentador, secados y formulados como polvo humedecible y almacenado a 5 °C. La viabilidad de los conidios secos se determinó antes del comienzo de los experimentos de campo en agar. La concentración de suspensiones de conidios fue ajustada a 2×10^6 conidios viables por ml^{-1} . La viabilidad de los esporas en las suspensiones aplicadas al campo siempre fue revisada dos veces rociando por suspensión en agar de extracto de malta (1 g de extracto de malta por litro) modificado con tetraciclina a 15 mg l^{-1} y estreptomycin a 100 mg l^{-1} en el huerto y evaluando el porcentaje de esporas germinadas después de la incubación a 20 °C durante 24 horas.

Ensayo de semillero

Se sembraron semillas de manzano cv Golden Delicious (G.J. Steingaesser & Comp.GmbH, Miltenberg, Alemania) en arena húmeda y se estratificaron a 4 °C durante 6 semanas en oscuridad. Después, se sembraron más semillas en la arena húmeda a temperatura ambiente y a la luz del día. Después de aproximadamente 14 días, las semillas jóvenes fueron trasplantadas a materas , una semilla por matera (6 cm cuadrados, 8 cm de alto). Se sembraron semillas durante 23 días con ciclos de 16 horas de luz a 18 °C y 8 horas en oscuridad a 12

93

°C. Las plantas usadas en los experimentos tuvieron al menos 4 hojas totalmente expandidas.

Las semillas fueron rociadas con suspensiones de conidios de *V. inaequalis* ($1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$) hasta agotar la suspensión y fueron puestas en una cámara húmeda compuesta de bandejas plásticas cerradas con una tapa plástica transparente. Después de 2 días de incubación a 15 °C con luz difusa, se quitaron las tapas de las bandejas y las semillas se incubaron durante 3 a 4 días a 85 % RH, 15 °C y 16 horas luz por día. Después de eso, semillas inoculadas con *V. inaequalis* fueron rociadas con suspensiones de los aislados anteriormente encontrados o agua que contenía 0.01% Tween 80 como control. Se usaron dos semilleros por cada replica de cada tratamiento. Los grupos de 2 semillas inoculadas fueron colocadas en una carpa de polietileno en un diseño de bloque con 6 bloques (réplicas) y aleatoriedad dentro de los bloques. Se evitó el contacto entre hojas de plantas vecinas o el polietileno. Las semillas fueron sembradas durante 9 a 12 días a 15 °C, con 16 horas de luz por día a $138 \mu \text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

De ambas semillas de cada replica, se removieron cuidadosamente las cinco hojas verdaderas más bajas (experimentos 1-5) o la hoja más joven recién abierta al principio del experimento (etiquetados con un anillo metálico; "hojas jóvenes") y se removieron cuidadosamente los 3 hojas viejas siguientes (experimentos 6-14); "hojas viejas"). Las hojas de cada grupo replica de hojas fueron agrupadas, puestas en botellas de Duran (100 ml) que contenían 15 ml de agua de grifo con 0.01% Tween 80 para muestras que contenían 2 hojas más jóvenes o 30 ml para

muestras de hojas que contenían 10 hojas (experimentos 1-5) o 6 hojas (experimentos 6-14). Las botellas se agitaron con un agitador a 700 OCS min⁻¹.

Se determinó la concentración de conidios de *V. inaequalis* por cada suspensión con la ayuda de un hemocitómetro. Se midieron las superficies de hoja de cada grupo replica de hojas con un medidor de área (Li-COR Biosciences, model 3100, Lincoln, USA.).

Ensayo de huerto

Se podaron varias hileras de variedad Jonagold dentro de un huerto manejado orgánicamente en Randwijk, países bajos, durante la primavera y el verano de 2006 de modo que los árboles produjeron nuevos brotes con hojas nuevas altamente susceptibles de *V. inaequalis*. Dependiendo del desarrollo del árbol y las condiciones de crecimiento para los arboles para se llevo a cabo la poda de los árboles aproximadamente 3 a 5 semanas antes de que se usara un grupo de árboles para un experimento. Además, se removió la mayoría de frutos jóvenes de los árboles para estimular el desarrollo de nuevos brotes. Los arboles usados para experimentos a principios del verano (experimentos 1 a 4) no fueron tratados para control de la sarna del manzano en el 2006. Los arboles usados en experimentos posteriores después de mediados de Julio fueron tratados con un programa de azufre como de costumbre para el huerto orgánico a principios de la estación para retardar la epidemia de la sarna del manzano pero permanecieron sin ser tratados al menos 3 semanas antes y durante los experimentos.

95

Se llevo a cabo una serie de 8 experimentos, cada uno en un grupo diferente de árboles. Por cada experimento se escogieron de 2 a 6 árboles, dependiendo de la cantidad de brotes recién producidos por cada uno de 6 bloques (réplicas). Dentro de cada bloque, se realizaron 7 tratamientos. Por cada tratamiento (por replica) se utilizaron 3 brotes producidos en la misma rama. Los brotes fueron etiquetados con anillos metálicos con color para que las 2 hojas más jóvenes totalmente expandidas al día del primer tratamiento se pudiesen distinguir de las otras hojas del brote. Los tratamientos consistieron en rociar agua del grifo que contenía 0.01% Tween 80 como control, o suspensiones de esporas recién producidas del antagonista *Cladosporium cladosporioides* H39. Se realizaron tratamientos separados con esporas producidas por fermentador formuladas como polvo seco y resuspendidas en agua del grifo que contenía 0.01 % TWEEN 80. Se hicieron aplicaciones con rociador usando un rociador de bolso de aire comprimido a 250 KPA hasta escurrir. Los diferentes experimentos se llevaron a cabo en el periodo entre Junio 22 y Septiembre 28 del 2006. Los experimentos comenzaron con el primer tratamiento 1 a 3 días después de que un periodo de infección por *V. inaequalis* había sido predicho de acuerdo con la tabla Mills basada en la duración de la humedad de la hoja y la temperatura. Las fechas de inicio de los 8 experimentos fueron Junio 22, Junio 29, Julio 6, Julio 31, Agosto 3, Agosto 7, Agosto 21 y Agosto 24 de 2006. En el experimento 8 el tiempo entre el periodo de infección esperado y la primera aplicación se prolongó a diez días pero las hojas ya estaban etiquetadas 1 a 3 días después del periodo de infección esperado como en los otros experimentos. Durante todos los experimentos, se realizaron

tratamientos posteriores a intervalos de 3 a 4 días. En los primeros 3 experimentos, se muestrearon hojas 18 días después del primer tratamiento y por consiguiente a los 19 a 21 días después de un periodo de infección esperado. En los experimentos 4 al 7, se tomaron muestras de hojas 24 a 25 días después del primer tratamiento (y por consiguiente 25 a 28 días después de un periodo esperado de infección para incrementar el periodo de tiempo para la esporulación de *V. inaequalis* y para posibles interacciones antagonistas. En el experimento 8, se tomaron muestras de hojas 24 días después de la primera aplicación y por consiguiente 34 días después del periodo de infección esperado.

En cada experimento, se agruparon las 2 hojas más jóvenes totalmente expandidas al principio en el experimento junto con las 2 hojas más jóvenes siguientes (expandidas durante el curso de los experimentos) para los 3 brotes pertenecientes al mismo replica de modo que una muestra constará de 12 hojas ("hojas jóvenes"). Del mismo brote, las siguientes 3 a 12 hojas más viejas, dependiendo del tamaño del brote, fueron también tomadas como muestra y agrupadas de modo que las muestras constaran de 9 a 36 hojas ("hojas más viejas"). La cantidad promedio de hojas mayores tomadas como muestra en los diferentes experimentos fue 21.8. Se pusieron muestras de hojas jóvenes en botellas de vidrio de 250 ml. 2 horas después, se agregaron 100-150 ml (dependiendo de la cantidad de hojas) de agua del grifo con 0.01% Tween 80 y las botellas se agitaron con un agitador a 700 OCS min^{-1} durante 10 min. Se procesaron muestras de hojas mayores en la misma forma usando botellas plásticas de 1000-ml con 150-350 ml (dependiendo del número de hojas) de agua

97

de grifo antes de agitarse. De las suspensiones obtenidas, se almacenaron submuestras de 6 ml a -18°C . Se determinó la concentración de conidios de *V. inaequalis* para cada suspensión con la ayuda de un hemocitómetro. Se midió la superficie de la hoja de todas las hojas por muestra con un metro de área.

Estadísticas

Se calculó la cantidad de conidios de *V. inaequalis* producidos por cm^{-2} de hoja por réplica. En caso de no detectar conidios, se fijó una detección límite a un conidio contado en la suspensión conidial, lo que tuvo como resultado un límite de detección promedio para los distintos experimentos de aproximadamente 100 conidios por cm^{-2} , por ejemplo, variando, dependiendo de las superficies de las hojas para los distintos réplicas, entre 74 y 212 cm^{-2} para los primeros 3 experimentos realizados bajo condiciones controladas. Los datos obtenidos para dos edades diferentes de hojas fueron transformados a logaritmos naturales y analizados separadamente por edad de la hoja mediante ANOVA. Los experimentos llevados a cabo bajo condiciones controladas se analizaron por separado comparando las medias de los tratamientos de control y los tratamientos antagonistas individuales usando pruebas LSD no protegidas ($\alpha=0.05$). Ya que los P-valores de ANOVAS a menudo fueron mayores a $P=0.05$, no se hicieron comparaciones múltiples adicionales entre los tratamientos antagonistas (Ott y Longnecker, 2001). Para los experimentos de campo, los datos transformados a logaritmos naturales obtenidos para dos edades diferentes de hoja se analizaron separadamente por edad de hoja mediante ANOVA con un diseño de bloque, con

experimentos individuales considerados como bloques principales y se hicieron tratamientos al azar dentro de los 6 bloques réplicas de cada experimento. Se indicaron los efectos significativos del tratamiento desde el punto de vista estadístico (pruebas LSD protegidas $\alpha=0.05$).

Resultados

Aislamiento de hongos de las colonias de *V. inaequalis* y preselección

Con frecuencia se observó crecimiento de hongos diferentes a *V. inaequalis* en colonias esporulantes del patógeno y se obtuvieron varios cientos de aislados fúngicos. Los aislados fueron agrupados según el momento de aparición de la colonia y se probaron en total 148 aislados que representaban distintos tipos de colonias. 131 de los 148 aislados produjeron más de 1×10^5 esporas o células de levadura por lámina y fueron sembrados a diferentes temperaturas y potenciales de agua. De estos 131 aislados restantes, todos lograron crecer a 5 °C; 16 no crecieron a -16 MP. 14 crecieron a 36 °C de los cuales 1 aislado no creció a WP=10 MPa. Ya que muchos de esos aislados con la combinación de características preferida pertenecían a *Cladosporium spp.*, solo se probó un subgrupo de aislados escogidos al azar dentro este grupo en semilleros. En total, se probaron adicionalmente 63 de los 102 aislados en bioensayos en semilleros de manzano.

Pruebas de semillero

Se llevaron a cabo 14 experimentos en semilleros. En los tratamientos de control de los primeros cinco semilleros, la producción de conidios en las cinco hojas más jóvenes del semillero fue en promedio 3596 conidios cm^{-2} y varió para los diferentes experimentos entre 1339 y 1509 conidios cm^{-2} (valores transformados). Dado que la producción de conidios fue alta en la hoja más joven y mucho menor en las hojas más viejas se decidió muestrear dichas hojas por separado en los experimentos siguientes. En los experimentos 6-14, la conidiación promedio en la hoja joven fue de 2896 conidios cm^{-2} y osciló para los diferentes experimentos entre 728 y 6186 conidios por cm^{-2} (valores transformados). Para las hojas más viejas, la conidiación promedio fue de 453 conidios por cm^{-2} y osciló para los diferentes experimentos entre 144 y 1313 conidios por cm^{-2} (valores transformados). La variación en la conidiación fue no solo alta entre experimentos sino también dentro de los experimentos entre grupos de semilleros réplicas.

La mayoría de los 80 candidatos aislados probados en semilleros no redujo significativamente desde el punto de vista estadístico la conidiación de *V. inaequalis*. Un aislado, *Cladosporium cladosporioides* H39 causó una reducción significativa en las hojas jóvenes o mayores lo cual pudo repetirse en experimento independientes posteriores. Sin embargo, la eficacia de este antagonista (calculadas con base en valores transformados para las hojas jóvenes) varió entre 55 a 79% para *Cladosporium cladosporioides* H39 en los experimentos en los

cuales este fue probado y la reducción de conidiación fue en algunos casos no significativa desde el punto de vista estadístico. (Tabla 1). Algunos otros aislados mostraron un fuerte efecto antagonista significativo desde el punto de vista estadístico en un experimento pero dichos efectos similares no pudieron ser repetidos. Dichos aislados pertenecían a *A.pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *P. pinodella*, y *Cladosporium spp.* En ningún caso se observó incremento en la conidiación de *V. inaequalis* después de la aplicación de los aislados candidatos.

Prueba de huerto del 2006.

La sarna del manzano se desarrolló de manera moderada en el huerto antes de que el primer experimento comenzara en Junio 22. En Junio y en la primera mitad de Julio, condiciones secas acompañadas de temperaturas diarias a menudo por encima de los 30 °C no fueron favorables para un desarrollo adicional de la sarna del manzano. Después de eso, el tiempo frío y lluvioso fue bastante favorable para la sarna del manzano hasta el final de los experimentos.

Durante los primeros 3 experimentos llevados a cabo bajo condiciones secas y cálidas se encontraron 2.1 a 12.8 x 1000 conidios por cm⁻² (valores transformados) en hojas secas y 9.5 a 40.3 x 1000 conidios por cm⁻² sobre hojas mayores en terrenos de control tratados con agua (Tabla 2 A, B). Después de que el clima cambió a condiciones húmedas y frías a mediados de Julio, se encontraron 46.3 x 1000 conidios por cm⁻² sobre hojas jóvenes y 9.8 x 1000 conidios por cm⁻² en

hojas de los tratamientos de control en el experimento 4. Durante los experimentos siguientes las cantidades de conidios se incrementaron a 227.3×1000 conidios por cm^{-2} sobre hojas jóvenes y 132.1 conidios por cm^{-2} sobre hojas mayores en el experimento 8.

Se evaluó la viabilidad de las esporas aplicadas en las 25 fechas de aplicación durante el curso de la serie de experimentos para cada suspensión en una lámina de agar rociada en el campo. La viabilidad del *Cladosporium cladosporioides* H39 fue de 92% (oscilando entre 82 y 99%). Las esporas formuladas de *Cladosporium cladosporioides* H39 tuvieron una viabilidad de aproximadamente un 47% al principio de los experimentos. Cuando se prepararon suspensiones de esporas para aplicaciones en campo, las esporas formuladas de *Cladosporium cladosporioides* H39 formaron grupos conformados por aproximadamente 5 a 50 esporas en las suspensiones para rociar de modo que no fue posible determinar de manera precisa la germinación de las esporas. La mayor parte de grupos de suspensiones rociadas en las 11 aplicaciones mostraron crecimiento fúngico. Solo algunos grupos de esporas aplicadas entre el 10 de Agosto y el 29 de agosto mostraron crecimiento fúngico. Se puede asumir que las esporas formuladas almacenadas que habían sido usadas perdieron su vigor durante el almacenamiento para los últimos tratamientos durante el experimento 4 y todos los tratamientos durante los experimentos 5 y 6. Desde finales de Agosto en adelante, se usó un nuevo grupo de esporas formuladas del cual la mayoría de grupos de esporas mostró crecimiento fúngico. No se encontraron efectos de tratamientos significativos cuando los datos fueron analizados para cada

experimento por separado. Para un análisis global, se excluyeron los experimentos 1, 5 y 6 dado que el formulado viable *Cladosporium cladosporioides* H39 no estaba disponible durante el experimento 1 y la y la viabilidad fue baja durante los experimentos 5 y 6. Se encontró una reducción significativa del número de conidios por cm^2 para los tratamientos con *Cladosporium cladosporioides* H39 tanto en hojas jóvenes como viejas (Tabla 2 B). En promedio, la producción de conidios se redujo en un 42% en hojas jóvenes y 38% en hojas más viejas. Esta tendencia se encontró durante los primeros 3 experimentos llevados a cabo bajo baja presión de la enfermedad así como durante los últimos 2 experimentos llevados a cabo bajo alta presión de la enfermedad. Las esporas no formuladas del aislado no redujeron la conidiación de *V. inaequalis*. Al aplicarse la formulación de *Cladosporium cladosporioides* H39 que contenía solo unos pocos o ni siquiera un conidio vivo, durante los experimentos 5 y 6, no se encontró una tendencia a que la formulación en si misma tuviese algún efecto reductor en la conidiación (Tabla 2A).

Ejemplo 2 prueba de huerto del 2007

Material y métodos

Inoculo fúngico

El *Cladosporium cladosporioides* H39 fue producido como en el ejemplo 1. El producto formulado contenía 2.0×10^9 esporas g^{-1} con una viabilidad del 20%. Durante el experimento, el grupo de H39 formulado fue almacenado a 4 °C en oscuridad en bolsas plásticas. Se hicieron suspensiones agregándole los gránulos

103

formulados al agua Tween (0.01 %) y revolviéndola sin ningún pretratamiento adicional. La concentración final fue de 1×10^7 esporas por ml^{-1} , equivalentes a 2×10^6 esporas viables por ml^{-1} .

Se produjeron esporas de *Cladosporium cladosporioides* R406 en cajas de Petri en agar de harina de avena (20 g de harina de avena, 15 g de agar, 1000 ml de agua del grifo) a 20 °C con 12 horas en oscuridad por día. Después de 2 semanas de incubación, las esporas fueron suspendidas en agua del grifo que contenía 0.01% Tween 80 y agregadas a las láminas. La suspensión se filtró mediante gaza (malla de 200 μm) para remover las células de micelios y se contó la cantidad de esporas usando un hemocitómetro. Las esporas producidas fueron de 8 a 30×10^8 esporas por lámina de agar (90 mm de diámetro) con una viabilidad promedio de 93%, que osciló entre 73 y 97% para las suspensiones preparadas en fechas diferentes. Todo el tiempo se revisó la viabilidad de las esporas en las suspensiones aplicadas al campo rociando suspensión en el agar de extracto de malta (1 g de extracto de malta, 15 g de agar, 1000 ml de agua de la llave, modificado con tetraciclina a 15 mg l^{-1} y estreptomycin a 100 mg l^{-1} en el huerto y evaluando el porcentaje de esporas germinadas después de la incubación a 18 °C durante 24 horas.

Huerto

El experimento se llevó a cabo en 3 hileras de la variedad Jonagold dentro de un huerto manejado orgánicamente en Randwijk, países bajos. El objetivo del experimento fue controlar la epidemia de verano de *Venturia inaequalis* (Vi)

mediante aplicaciones antagonistas comenzando a finales de Junio. Por lo tanto era esencial permitir la iniciación de una epidemia leve a moderada en los huertos durante la estación primaria. El tiempo de las aplicaciones de azufre fue previsto de forma que las infecciones primarias por ascosporas pudieran ocurrir pero la evolución de la epidemia pudiera controlarse. No se planearon aplicaciones de azufre más allá de finales de Mayo. Las condiciones de tiempo inusuales durante la estación primaria del 2007 con un periodo de 4 semanas sin lluvias fueron muy desfavorables para la liberación e infección de ascosporas VI. Después de que el tiempo se tornó más favorable después de Abril, se desarrolló una epidemia leve de sarna del manzano hasta comienzos del experimento. No se realizaron tratamientos con azufre para reducir la evolución de la epidemia.

Diseño experimental, tratamientos y valoraciones

El experimento se llevó a cabo en un diseño con 6 bloques, con 2 bloques en cada una de las 3 hileras de arboles. Cada bloque estuvo conformado por 4 terrenos cada uno con cuatro arboles. Entre los terrenos, 2 árboles no tratados sirvieron como barrera. Los diferentes tratamientos fueron distribuidos al azar en dichos terrenos. Se planeó rociar los 4 árboles de cada terreno a un ritmo de 2 litros por terreno 2 veces por semana con los siguientes tratamientos: (1) agua de grifo agregándole Tween 80 (0.01%) como control; (2) suspensión de H39 formulado (2×10^6 esporas ml^{-1}); (3) suspensión de R406 formulado (2×10^6 esporas por ml^{-1}). Las aplicaciones se hicieron dos veces por semana en 16 fechas entre Junio 28 y Agosto 20 un rociador manual que operaba con aire

comprimido (AZO9, Edecon, Ede, países bajos) con una pluma de 2 m y una boca (Birchmeir Helico saphir 1.2, 2 F-0.6; presión de 250 kPa). Dado que las esporas formuladas de R406 no estaban disponibles en el momento del experimento, el tratamiento (3) se llevó a cabo con esporas recién producidas en el laboratorio para cada aplicación. Las aplicaciones de R406 dos veces por semana comenzaron con un retraso el 12 de Julio de modo que este hongo se aplicó solo en doce fechas. Debido a que no se pudieron producir suficientes esporas, solo ramitas seleccionadas y etiquetadas fueron objeto de rociadas múltiples en vez de tratamientos a todo el árbol.

Valoraciones

Producción de conidios

La producción de conidios fue valorada en hojas jóvenes susceptibles desarrolladas durante el curso del experimento en 3 fechas de muestreo para las hojas tratadas con agua -Tween como control, o suspensiones conidiales de H39 y para dos fechas de muestreo de R406. Las fechas de muestreo se escogieron de modo que grupos de hojas susceptibles presentes durante un periodo de infección predicho fuesen muestreados aproximadamente 5 semanas después del periodo de infección. Se usó la tabla de Mills, basada en la duración de la húmeda de la hoja, para predecir periodos de infección. Por cada muestreo, la segunda hoja más joven recién abierta fue etiquetada 1 a 3 días después de un periodo de infección predicho en un grupo de 3 ramitas pertenecientes al mismo árbol en cada terreno. Luego de 5 semanas, las 2 hojas recién abiertas en la fecha de

106

etiquetado y las siguientes 2 hojas más jóvenes, abiertas después del etiquetado, fueron muestreadas dando como resultado una muestra compuesta por 12 hojas por terreno. Las muestras de hoja fueron puestas en botellas de vidrio de 250 ml. Dos horas después, se agregaron 100-150 ml de agua de grifo con 0.01% Tween 80 (dependiendo de la cantidad de hojas) y la botellas se agitaron con un agitador (Stuart scientific SD1, UK) a 700 OCS por min^{-1} durante 10 minutos. De las suspensiones obtenidas, se almacenaron submuestras de 6 ml a -18°C y la concentración de conidios de *Vf* se determinó posteriormente para cada suspensión con la ayuda de un hemocitómetro. Se midió la superficie de hoja de todas las hojas por muestra con metro de área (LI-COR Biosciences, model 3100, Lincoln, U.S.A)

Las fechas de muestreo fueron Agosto 6 (de las hojas etiquetadas en Julio 2), Agosto 16 (de hojas etiquetadas en Julio 12), y Agosto 20 (de hojas etiquetadas en Julio 16).

Colonización endofítica y epifítica. El 4 de Octubre se recolectaron de cada terreno veinte hojas de árbol etiquetadas tratadas con agua –Tween (control) o suspensiones de esporas de H39 y de ramitas tratadas con suspensiones de esporas de R406. Todas las hojas muestreadas se habían desarrollado en los árboles durante el periodo entre Junio 28 y Agosto 20 cuando la serie de aplicaciones con rociador se había hecho. Se puede asumir, por consiguiente, que todas las hojas fueron objeto de una o varias aplicaciones de esporas en las etapas de desarrollo joven.

(57)

De cada hoja, se cortó un disco de hoja (9 mm de diámetro) usando un sacabocados. Los 20 discos de hoja resultantes por muestra fueron agrupados en 50 frascos esterilizados de 50 ml que contenían 10 ml de agua-Tween estéril (0.01%) y los frascos se agitaron usando un agitador a alta velocidad (700 OCS min⁻¹) durante 10 minutos. De las suspensiones resultantes, se prepararon disoluciones seriales (1:10) y se pusieron 100 µl de suspensiones disueltas y no disueltas en láminas en cada una de 2 láminas de agar que contenían agar de malta (10 g de extracto de malta, 15 g de agar, 1000 ml de agua de grifo) modificada con 100 mg l⁻¹ de estreptomina y 15 mg l⁻¹ de tetraciclina. Las láminas se incubaron a 20 °C en oscuridad y se contaron colonias de *Cladosporium cladosporioides*, otro hongos hifales y levaduras después de 4, 7, y 11 días. De los conteos de colonias, se calculó el número de colonias que formaba unidades (CFU) por cm² superficie de hoja por cada muestra. Después de agitar los discos de hojas para remover epifíticamente los hongos presentes, los 20 discos de hoja agrupados por muestra fueron superficialmente esterilizados y homogeneizados en 5 ml de agua estéril usando un mortero para esterilizar la superficie, los discos de hoja fueron sumergidos en 96% de etanol seguido de una inmersión durante 1 minuto en hipoclorito de sodio 0.5% y posteriormente enjuagados 3 veces con agua estéril. De los homogeneizados resultantes, se prepararon disoluciones seriales (1:10) en agua estéril y 100 µl de suspensiones diluidas y no diluidas fueron puestas en lamina en cada una de las 2 láminas de agar de malta que contenían 100 mg l⁻¹ de estreptomina y 15 mg l⁻¹ de

tetraciclina. Las láminas fueron incubadas y se valoraron las colonias de hongos endofíticos como se describió anteriormente.

Estadísticas

La cantidad de conidios de *V. inaequalis* producidos por cm² de superficie de hoja fue calculada por muestra de réplica. Se compararon los valores del tratamiento de control transformados a logaritmos naturales con los tratamientos antagonistas individuales separados por ambas edades de la hoja usando pruebas LSD no protegidas ($\alpha=0.05$). Las cantidades de CFU por cm² transformados a logaritmos naturales de superficie de la hoja fueron analizados mediante ANOVA seguido de 2 pruebas LSD ($\alpha=0.05$) bilaterales.

Resultados

Las condiciones del tiempo durante el periodo de los experimentos, con frecuentes precipitaciones y temperaturas moderadas fueron muy favorables para la sarna del manzano. Al comienzo de los experimentos solo se presentaron síntomas leves en los huertos. Al final se observaron síntomas de la sarna del manzano en hojas de árboles dentro de los campos experimentales y en las áreas vecinas.

Las esporas de R406 producidas recientemente para cada aplicación tuvieron alta tasa de germinación, generalmente por encima de 80% (Tabla 3). Las esporas formuladas del H39 germinaron entre 20 -30 % durante las primeras semanas del experimento, pero la germinación cayó a 4-16 % para los 4 últimos tratamientos.

El valor excepcionalmente alto para la germinación de esporas de 76% en la primera fecha en que se realizó el rociado puede explicarse mediante variación experimental debido al tamaño pequeño de la muestra de solo 1 lámina rociada bajo condiciones de huerto.

En las hojas muestreadas el 6 de Agosto, 16 de Agosto y 20 de Agosto de arboles tratados con agua, se produjeron 77.200 (13.900 a 139.300) 45.300 a 55.200 y 32.200 (*Cladosporium cladosporioides* 00 a 111.800) de conidios cm-2 en promedio (medias transformadas, rango para 6 réplicas va en paréntesis, Figura 2). Por consiguiente, la variación entre réplicas fue bastante alta. En hojas de arboles tratadas con H39, el numero de esporas fue significativamente más bajo desde el punto de vista estadístico con 24.200 conidios por cm-2 (reducción del 69%) en la primera fecha de muestreo y 22.000 conidios por cm-2 (reducción del 51%) en la segunda fecha de muestreo. Para la última fecha de muestreo no se observó ningún efecto de tratamiento en el H39. Para las fechas de muestreo cuando las hojas fueron tratadas cuando el R406 estuvo disponible, los conteos de conidios por cm-2 el 16 de Agosto fueron de 24.300 lo que tuvo como resultado una reducción significativa desde el punto de vista estadístico de conidios de alrededor del 46%. Para el 20 de Agosto, solo se observó una reducción del 15% y los conteos no difirieron del tratamiento de control.

No se observaron efectos del tratamiento en el desarrollo de la hoja o síntomas de fitotoxicidad.

150

Cerca a la caída de la hoja, se valoró la colonización endofítica y epifítica de las hojas, colocando en lamina hojas lavadas y homogeneizados de hojas esterilizadas en la superficie en agar y haciendo el conteo de las unidades formadoras de colonia UFC. La colonización endofítica por medio de *Cladosporium cladosporioides* fue significativamente más alta y la colonización epifítica por *Cladosporium cladosporioides* tendió a ser más alta para las hojas que habían sido tratadas con H39 durante el verano. La colonización endofítica y epifítica de las hojas tratadas con H39 por parte de otras hifas de hongos tendió a ser más baja en comparación con las hojas no tratadas.

La colonización epifítica por parte de la levadura fue significativamente más baja para las hojas tratadas con H39.

Ejemplo 3 prueba de campo prueba 2005/2006

Material y métodos

Diseño y tratamientos del experimento

En el otoño del 2005, se aplicaron 25 aislados fúngicos pertenecientes a diferentes especies incluyendo *Cladosporium cladosporioides* R406 en hojas de manzano de un huerto manejado orgánicamente en Randwijk, países bajos, y las hojas tratadas fueron opuestas en el suelo del huerto hasta la primavera siguiente. La selección de candidatos se basó en los resultados de la preselección llevada a cabo con base en la viabilidad económica y posibles riesgos (ver ejemplo 1). Las esporas del aislado R406 se produjeron en agar de harina de avena (incubación

de 28 días a 18 °C). Las suspensiones de esporas (500 ml por aislado) se prepararon sumergiendo cultivos en agar con agua estéril que contenía Tween 80 al 0.01%. Después de frotar suavemente con una espátula de caucho para remover las esporas de los cultivos fúngicos se filtraron las suspensiones por medio de gaza de nylon estéril con una malla de 200 µm. Las concentraciones de las suspensiones se determinaron con la ayuda de un hemocitómetro y se ajustaron a 2×10^6 esporas por ml⁻¹. Se llevaron a cabo aplicaciones usando rociadores de mano que funcionan con aire a presión. El 17 de Octubre se recolectaron las hojas de la extensión de los brotes de los árboles para realizar las aplicaciones con rociador bajo condiciones controladas en un compartimiento de invernadero. Durante el período entre la recolección de hojas y la fijación de hojas a las redes en el piso del huerto, se almacenaron las hojas a 5 °C. Las hojas fueron fijadas en redes, cada una con 40 hojas escogidas al azar, el 18 y 19 de Octubre. El 20 de Octubre se rociaron 4 redes con hojas por réplica de cada tratamiento con esporas de suspensión o agua con aproximadamente 20 ml de las suspensiones (o agua en los controles de tratamiento) a ambos lados. Dos de las redes que contenían 40 hojas se destinaron para determinar la producción potencial de ascosporas de *V. inaequalis*, las otras dos redes para determinar las densidades de población de *V. inaequalis* mediante TaqMan-PCR. Después de las aplicaciones, las hojas se dejaron secar nuevamente aproximadamente 30 minutos después. Las redes con hojas tratadas se fijaron al piso el 21 de Octubre en tierra orgánica dentro del huerto orgánico en Randwijk. Hubo 6 bloques (réplicas) en diferentes hileras de el huerto.

También se roció cada suspensión de espora en una lámina de agar (1/10 agar de malta). Las láminas fueron incubadas a 18 °C durante 2 días y se determinó la tasa de germinación. Las esporas de R406 tuvieron una viabilidad de 90%.

Valoraciones

En Enero 23, 24, 25, 30 y 31 del 2006, respectivamente se recolectaron las redes de las réplicas 1 a 6 destinadas a cuantificar las densidades de población de *V. inaequalis* mediante el TaqMan-PCR en el huerto, y se enjuagaron con agua de grifo para remover el suelo adherido y se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente. Se quitaron de las redes los residuos de hojas de las 2 redes por replica en cada tratamiento, y se cortaron en pedazos de 1-2 cm y se congeló una muestra de 5-10 g la cual fue pulverizada en un molino de laboratorio con un filtro de malla de 1mm. Las muestras pulverizadas fueron almacenadas a -18 °C. Se extrajo el ADN y se cuantificó el ADN de *V. inaequalis* mediante PCR específico de especie en tiempo real (TaqMan-PCR).

El 20 de Marzo (bloque A), Marzo 22 (bloque B), Marzo 27 (bloque C), Marzo 29 (bloque D), abril 3 (bloque E) y el 5 de abril (bloque F), se recogieron las redes en el huerto para cuantificar la producción potencial de ascosporas después de la extracción de ascosporas por bombeo de aire en el agua. Los residuos de hojas de las 2 redes por replica de cada tratamiento fueron secados con aire (20 °C, 70%RH, 2 días) y se determinó el peso. Posteriormente, se esparció una sub muestra de residuos de hoja de máximo 7-17 g secado al aire en una bandeja plástica en papel de filtro húmedo. Las bandejas fueron cubiertas con una bolsa

plástica y los residuos de hojas fueron incubados en estas cámaras húmedas durante 7 días a 20 °C en la oscuridad seguida de 14 días a 20 °C con 12 horas de luz al día para permitir la maduración (de una fracción sustancial) de ascas.

Se utilizaron diferentes ambientes de clima para la incubación pero las hojas pertenecientes al mismo bloque se incubaron siempre en el mismo ambiente. Luego de la incubación, los residuos de hojas fueron transferidos a botellas plásticas d 1000 ml que contenían de 150-350 ml de agua dependiendo de la cantidad de residuos de hojas. El aire fue bombeado a través del agua (250 litros por hora) lo que dio como resultado una gran turbulencia durante 2 horas. Después de eso, la suspensión resultante se pasó a través de un filtro (1 mm de malla) para quitar los restos de hojas. Se almacenaron 2 submuestras de la suspensión (8 ml) a -20 °C. La concentración de ascosporas se determinó microscópicamente mediante un hemocitómetro. Dicha producción se expresó como la producción por 80 hojas (fijadas al principio en el piso del huerto en otoño) o por residuos de hojas secas al aire por gramo presentes en la fecha de muestreo en la primavera. La producción de ascosporas por 80 hojas es resultado del posible efecto del tratamiento en la descomposición y la producción de ascosporas.

Estadísticas

Los datos obtenidos para los números de ascosporas fueron transformados a logaritmos naturales. Todos los datos fueron analizados mediante ANOVA. Se

compararon las medias del tratamiento del control con los tratamientos antagonistas individuales usando pruebas LSD ($\alpha=0.05$). Ya que los P-valores de ANOVAs a menudo fueron mayores a $P=0.05$, no se hicieron comparaciones múltiples adicionales entre tratamientos antagonistas.

Resultados

Se cuantificó la cantidad de ADN de *V. inaequalis* en residuos de hojas muestreados a fin de Enero de 2006 mediante PCR en tiempo real (TaqMan-PCR) usando una sonda y un par de primer específico para la especie. Se calculó La cantidad total de ADN de *Venturia inaequalis* en los residuos totales que quedaron de las 80 hojas. Los residuos de hojas tratadas con *Cladosporium cladosporioides* R406 Tuvieron significativamente menos ADN de *Venturia inaequalis* en comparación con el control no tratado (Tabla 6).

El número de ascosporas producido en hojas en primavera fue alto en promedio de 7.5×10^{-5} (valores transformados) para los residuos de 80 hojas del tratamiento del control (Tabla 7). Por gramo de residuo de hoja se produjeron 3.4×10^{-4} en el tratamiento de control (Tabla 8). Para los residuos de hojas tratados con el aislado *Cladosporium cladosporioides* R406 los conteos de ascosporas fueron aproximadamente 70% más bajos. Estas diferencias entre el tratamiento de control y el tratamiento con R406 fueron significativas desde el punto de vista estadístico tanto en el número de ascosporas producidos en los residuos de las 80 hojas como en el número de esporas producidas por gramo de residuo de hoja

(Tablas 7 y 8). Ningún otro tratamiento con diferentes candidatos antagonistas tendió a causar una reducción de ascosporas.

Ejemplo 4 efecto del *Cladosporium cladosporioides* H39 en la producción de conidios de *Venturia inaequalis* bajo condiciones de huerto

Objetivo

Las aplicaciones de conidios del antagonista *Cladosporium cladosporioides* H39, formuladas de manera piloto como gránulos dispersables en agua (GDA), redujeron la producción de conidios del patógeno de la sarna del manzano *Venturia inaequalis* bajo condiciones de huerto en experimentos llevados a cabo en el 2006 y el 2007 (ver ejemplos 1 y 2). El objetivo del experimento llevado a cabo en el 2008 fue confirmar estos resultados en otra estación y obtener una primera idea acerca del mejor momento para las aplicaciones de antagonistas después de los periodos de infección predichos para *Venturia inaequalis*.

Producción de conidios de H39

Para aplicaciones en la huerto, los conidios de *Cladosporium cladosporioides* H39 fueron producidos en un sistema de fermentación estado sólido (sfs) por parte de PROPHYTA Biologischwer Pflanzenschutz GmbH, Alemania. Los conidios obtenidos fueron formulados como granulo dispersable en agua. Para conservar la calidad del producto, el producto final fue almacenado a 4 °C. La viabilidad de los conidios secos se determinó en agar de extracto de malta (1 g de extracto de malta por litro -1) antes de comenzar el experimento en campo. Los conidios

116

incubados durante 24 horas a 20 °C con tubos de germinación más largos que la mitad del diámetro mínimo de un conidio fueron considerados viables.

Ensayo de huerto

El experimento fue realizado en el huerto manejado orgánicamente en APPLIED Plant Research, Randwijk, países bajos en arboles de 8 años de edad cv Jonagold. El objetivo del experimento fue controlar la epidemia de verano de la sarna del manzano mediante aplicaciones antagonistas. Por lo tanto fue esencial permitir la iniciación de una epidemia en el huerto durante la estación primaria. Las condiciones del tiempo durante la estación primaria del 2008 favorecieron el desarrollo de la sarna del manzano y muchos síntomas de la sarna del manzano fueron encontrados en la huerto a principios de Junio. Una intensa granizada dañó gravemente el huerto. En Junio 24 y 26, se aplicó Topsin-M (a.i.500 g de metil tiofanato I-1, Certis Europe B.V., Maarsen, Países bajos) en una tasa de 140 ml por 100 litros de agua (aplicados a 1000 litros por ha⁻¹) en todo el huerto y los huertos vecinos con el fin de prevenir infecciones de chancro (*Nectria galligena*). No se hicieron más tratamientos con fungicidas para reducir la evolución de la epidemia antes o durante el experimento. Durante las semanas siguientes los árboles produjeron brotes abundantes con nuevas hojas. Estas hojas recién formadas, no dañadas por el granizo o que estuvieron fuera de contacto con los rociadores de fungicidas, fueron usadas en el experimento.

El experimento fue organizado en un diseño con 6 bloques, con 2 bloques en la misma hilera de arboles. Cada bloque constaba de 3 terrenos, cada uno con 4

árboles. Entre los terrenos, 2 árboles no tratados sirvieron como barrera. Los siguientes 3 tratamientos diferentes fueron asignados a los terrenos aleatoriamente: (1) no tratados como control; (2) suspensión conidial de H39 formulado (2×10^6 conidios viables ml^{-1} ; 2 litros por terreno). El aditivo en rociador Trifolio S-forte (Trifolio-M GmbH, Lahnau, Alemania) se agregó a la suspensión en un porcentaje de 2 ml por l⁻¹ para mejorar la capa de rocío en la superficie de la hoja. Se realizaron aplicaciones cada 2 semanas de H39 en Julio 22, Julio 24, Julio 28, Julio 31 Agosto 5, Agosto 7, Agosto 11 y Agosto 18. (3) El tercer tratamiento consistió en una aplicación semanal de azufre (Thiovit-Jet, syngenta Crop Protection BV., Roosendaal, países bajos; al 80% de azufre) en un porcentaje de 0.4 % (400 g por 100 litros de agua a 1000 por litro ha⁻¹). Los tratamientos de azufre se aplicaron en Julio 22, Julio 28, agosto 5, y Agosto 11.

El número de hojas afectadas por la sarna del manzano y el número de manchas con la sarna del manzano por hoja fueron valoradas para las hojas de 10 brotes de cada uno de los 4 árboles por terreno antes del inicio del experimento en Junio 11. En total 227 a 239 hojas fueron examinadas por terreno. En Septiembre 19, los síntomas de la sarna del manzano fueron valorados en 177 a 232 hojas por terreno que habían sido producidas después del inicio del experimento. Se estimó la gravedad de la enfermedad (porcentaje de superficie de hoja cubierta con síntomas de la sarna del manzano) usando las siguientes clases: 1. Sin la sarna del manzano; 2: 1-10 % de cubrimiento; 3: 11-50 % de cubrimiento; y 4: 51-100 % de cubrimiento. Se calculó el índice de severidad usando la formula:

$$DS = (0 \times N_1 + 1 \times N_2 + 2 \times N_3 + 3 \times N_4) / N_{\text{total}} * 100$$

En el cual N_1 , N_2 , N_3 y N_4 es el número de hojas agrupado en las clases, 1, 2, 3 y 4 respectivamente y N_{total} es el número total de hojas evaluado por terreno.

La producción de conidios de *Venturia inaequalis* se valoró en hojas jóvenes susceptibles desarrolladas durante el curso del experimento en 3 fechas de muestreo. Las fechas de muestreo se escogieron de modo que los grupos de hojas susceptible presentes durante un periodo de infección predicho fuesen muestreados aproximadamente 5 semanas después del periodo de infección. Se usó la tabla de Mills basada en la duración de la humedad de la hoja y la temperatura para predecir los periodos de infección. La segunda hoja más joven recién abierta se etiquetó 1 a 3 días después de un periodo de infección predicho en un grupo de 3 ramitas pertenecientes al mismo árbol en cada terreno. El periodo entre la infección predicha y la primera aplicación de *Cladosporium cladosporioides* H39 así como la cantidad de rociamientos y el periodo de protección mediante rociamientos difirió por fecha de muestreo (Figura 3). Después de 35 días, las 2 hojas recién abiertas en la fecha de etiquetado y la siguientes 2 hojas más jóvenes, abiertas después del etiquetado pero expandidas durante el curso del experimento, fueron muestreadas teniendo como resultado una muestra compuesta de 12 hojas por terreno. Las fechas de muestreo fueron Agosto 22 (de las hojas etiquetadas en Julio 18), Agosto 26 (de las hojas etiquetadas en Julio 22), y septiembre 4 (de las hojas etiquetadas en Agosto 1). Las doce hojas por muestreo fueron agrupadas y puestas en botellas de vidrio de

250 ml. Dos horas después, se agregaron 100-150 ml de agua de grifo con Tween 80 al 0.01% (dependiendo de la masa de la hoja) y las botellas fueron agitadas un agitador a 700 OCS min^{-1} durante 10 min. De las suspensiones obtenidas, se almacenaron submuestras de 6 ml a -18°C . La concentración de conidios de *Venturia inaequalis* se determinó para cada suspensión con la ayuda de un hemocitómetro. La superficie de hoja de todas las hojas por muestra se midió con un medidor de área.

Resultados y análisis

Los conidios de *Cladosporium cladosporioides* H39 producidos en la primavera del 2008, formulados como un gránulo dispersable en agua siguiendo el protocolo piloto y almacenados a 5°C tuvieron una viabilidad de 65 % al inicio de los experimentos. La viabilidad permaneció estable hasta el final del experimento.

Antes de que el experimento comenzara, la incidencia de la sarna del manzano en las hojas no difirió para los terrenos pertenecientes a los diferentes tratamientos. La incidencia media fue de 81.7% en terrenos usados como control, 84.6% para terrenos tratados más tarde con H39, y 84.3 % para terrenos tratados más tarde con azufre. Tampoco hubo diferencia desde el punto de vista estadístico con respecto al número de manchas de hoja por hoja, de modo que se puede asumir

que el desarrollo de la sarna del manzano fue similar en los diferentes terrenos antes de que comenzara el experimento.

En las hojas muestreadas en Agosto 22, Agosto 26 y Septiembre 4 de arboles no tratados se produjeron 35242 (11.447 a 74.870), 30.242 (18.926 a 59.497) y 32.533 (19.698 a 46.350) de conidios de *Venturia inaequalis* por cm^2 de superficie de hoja en promedio (medias transformadas, rango para 6 réplicas va en paréntesis) (Figura 4.). En las hojas de arboles tratados con *Cladosporium cladosporioides*, el número de esporas fue significativamente más bajo desde el punto de vista estadístico con 11.499 conidios de *Venturia inaequalis* por cm^2 de superficie de hoja en promedio (reducción del 67% con base en medias transformadas) en la primera fecha de muestreo y 15139 conidios por cm^2 de superficie de hoja (reducción del 50%) en la segunda fecha de muestreo. Para la última fecha de muestreo, no se observó ningún efecto significativo para las aplicaciones de *Cladosporium cladosporioides* H39 con 21.163 conidios por cm^2 de superficie de hoja (reducción del 35%) en hojas tratadas. Las aplicaciones de azufre tuvieron como resultado una reducción del número de conidios de *Venturia inaequalis* producidos por cm^2 de superficie de hoja para 2, 16 y 26 % para las diferentes fechas de muestreo (Figura 4.). La severidad de la sarna del manzano, valorada en septiembre 19, un mes después del último tratamiento con H39, fue de 2.2 para el tratamiento de control pero significativamente más baja desde el punto de vista estadístico con 1.8 para los terrenos tratados con H39 (Figura 5). En los terrenos tratados con azufre, la gravedad de la sarna del manzano fue de 2.0 lo cual no difirió significativamente de los otros tratamientos.

Durante el experimento de huerto, las condiciones ambientales dieron como resultado un alto número de períodos de infección y se favoreció el desarrollo de la sarna del manzano. Además, el desarrollo excepcional de nuevos brotes después de la granizada favoreció la epidemia de verano. Bajo una presión de enfermedad tan severa, los tratamientos con azufre no son a menudo suficientes para lograr el control de la enfermedad como también se encontró en nuestro experimento. Los tratamientos con el antagonista H39 redujeron la producción de conidios de *V. inaequalis* bajo condiciones así de severas, confirmando los resultados de los experimentos de huerto llevados a cabo en 2006 y 2007. El efecto más fuerte se encontró para la primera fecha de muestreo cuando comenzaron los tratamientos con H39 después de la infección predicha pero fueron continuados hasta cuatro días antes del muestreo. Para la tercera fecha de muestreo ya se habían realizado tratamientos múltiples con H39 antes del período de infección predicho pero el último tratamiento había sido aplicado 17 días antes del muestreo. En esta situación, la producción de conidios de *V. inaequalis* se redujo solo en un 35%. Dado que el efecto del antagonista podría también depender de factores ambientales que difirieron antes de las diferentes fechas de muestreo, se necesitan más datos de experimentos de huerto repetidos antes de que se pueda sacar alguna conclusión acerca del momento óptimo de las aplicaciones antagonistas.

Por primera vez también se valoró la severidad de la sarna del manzano después de los tratamientos con el antagonista H39. La severidad reducida de la sarna del manzano en el nivel alto de la sarna del manzano observado en la huerto

demostró que *Cladosporium cladosporioides* H39 tiene un alto potencial para controlar la epidemia de la sarna del manzano.

Ejemplo 5. Ensayo de huerto en el 2007/2008: Efecto de los tratamientos con *Cladosporium cladosporioides* H39 y R406 durante el verano en la producción de ascosporas de *Venturia inaequalis* en hojas tratadas después de sobrevivir el invierno

Objetivo

Los tratamientos de hojas de manzano durante el verano con suspensiones conidiales de los antagonistas *Cladosporium cladosporioides* H39 Y R406 llevaron a la reducción de la producción de conidios del hongo de la sarna del manzano *Venturia inaequalis* en hojas de manzano tratadas bajo condiciones de huerto (ver ejemplos 1 y 2).

El objetivo de una valoración adicional hecha en hojas tratadas en el huerto durante el experimento en el 2007 fue estudiar el efecto de dichos tratamientos en las hojas jóvenes en desarrollo con los antagonistas durante el verano en la producción de ascosporas por parte de *Venturia inaequalis* en hojas tratadas después de pasar el invierno.

Diseño del experimento. El experimento fue llevado a cabo en APPLIED Plant Research, Randwijk, países bajos. El objetivo del experimento fue valorar el potencial de las aplicaciones antagonistas para controlar la epidemia de la sarna del manzano y reducir la carga de inóculo de *Venturia inaequalis* producida en

hojas de manzano que sobrevivieron el invierno. Por lo tanto, fue esencial permitir la iniciación de una epidemia leve a moderada en el huerto durante la estación primaria. Las condiciones del tiempo inusuales durante la estación primaria del 2007 con un periodo de 4 semanas sin precipitaciones fueron muy desfavorables para la liberación e infección de *Venturia inaequalis*. El tiempo fue más propicio después de Abril y una epidemia leve de la sarna del manzano se había desarrollado cuando la primera suspensión fue aplicada. No se realizaron tratamiento con fungicidas para reducir la evolución de la epidemia antes o durante el experimento.

El experimento fue realizado en arboles de 8 años de edad cv Jonagold en un diseño con 6 bloques con 2 bloques en la misma hilera de arboles. Cada bloque constaba de 3 terrenos, cada uno con 4 árboles. Entre los terrenos, 2 árboles no tratados sirvieron como barrera. Los tres tratamientos diferentes fueron asignados a los terrenos aleatoriamente. Los arboles fueron tratados a una tasa de 2 litros por terreno dos veces por semana con los siguientes tratamientos: (1) agua de grifo modificada con Tween 80 (0.01%) como control, y (2) suspensión conidial de H39 formulada (2×10^6 a la 6×10^6 conidios ml⁻¹). Las aplicaciones se hicieron dos veces por semana en 16 fechas entre Junio 28 y Agosto 20. (3) El tercer tratamiento consistió en múltiples aplicaciones en rociador de suspensiones conidiales de *Cladosporium cladosporioides* R406. Los conidios recién producidos en cada fecha de aplicación fueron aplicados dos veces por semana en los 4 árboles de cada terreno replica en 12 fechas entre Julio 12 y el 20 de Agosto.

124

Producción de conidios de *Venturia inaequalis* durante el verano. El efecto de los tratamientos en la producción de conidios de *Venturia inaequalis* ha sido reportado como se hizo en el ejemplo 2.

Producción de ascosporas de *Venturia inaequalis* en hojas de manzano que pasaron el invierno.

El 12 de Julio de 2007 la segunda 2 hoja más joven recién abierta fue etiquetada en 25 ramitas por terreno. En algunos terrenos había menos ramitas disponibles. El 4 de Octubre de 2007, se muestrearon hojas que habían acabado abrirse en la fecha de etiquetado y las siguientes 2 hojas más jóvenes, abiertas después del etiquetado. Dependiendo de la disponibilidad de hojas en la fecha de la muestra, se recolectaron 16 a 65 hojas por terreno. Las hojas muestreadas de cada terreno fueron pesadas y fijadas entre 2 redes de hierro de 50x 50 cm (15 x 20 mm de malla) de modo que las hojas no se tocasen entre sí. Las redes con hojas se pusieron en el piso del huerto en tierra orgánica entre hileras de manzano del huerto orgánico en Randwijk y se fijaron con uñas metálicas de modo que la mayoría de la superficie de la red tocara el suelo. Hubo 6 bloques (réplicas) y las redes que contenían hojas de tratamientos diferentes (aplicados durante el verano) fueron distribuidas al azar dentro de los bloques.

El 26 de Febrero del 2008, se recogieron las redes. Los residuos de hoja de ambas redes por replica fueron agrupados, secados con aire (20 °C, 70% RH, 2 días) y pesados. Posteriormente, los residuos de hoja de cada muestra secados con aire fueron extendidos en bandejas plásticas separadas (50x 30 x 6 cm) en

papel de filtro húmedo. Las bandejas fueron cubiertas con una bolsa plástica y los residuos de hoja fueron incubados en esas cámaras húmedas durante 7 días a 20 °C en oscuridad seguido de 14 días a 20 °C con 12 horas de luz (75 uE) por día para permitir la maduración (de una fracción sustancial) de ascas. Después de la incubación los residuos de hoja fueron transferidos a botellas plásticas de 1000 ml que contenían de 150-350 ml de agua dependiendo de la cantidad de residuos de hoja. El aire (250 l h⁻¹) fue bombeado a través del agua dando como resultado una gran turbulencia durante 2 horas (Heye et al.198, Canadian Journal of Botany 59, 965-968; Phillion, 1995, Msc Thesis McGill University, Montreal, Canada). Después de eso, la suspensión resultante fue pasada a través de un filtro (malla de 1mm) para remover los restos de hojas. Se almacenaron 2 submuestras (8ml) de la suspensión a -20 °C. La concentración de ascosporas en la suspensión se determinó microscópicamente usando un hemocitómetro. La producción de ascosporas se expresó como la producción por g de hojas (fijadas al principio en el piso del huerto en otoño) o por gramo de residuos de hojas secas al aire presentes en la fecha de muestreo en primavera.

Resultados y análisis

En los residuos de hoja del tratamiento de control, se produjeron 220.089 ascosporas por g de residuo de hoja (peso seco). Esto fue equivalente a 37.171 ascosporas por g de tejido de hoja (peso fresco) presente en el otoño anterior (Tablá 9). En residuos de hojas que habían sido tratados con *Cladosporium cladosporioides* H39 en el verano anterior, solo se produjeron 109.044

126

ascosporas, equivalentes a 15.733 ascosporas producidas por gramo de tejido de hoja (peso fresco) presentes en el otoño anterior. Esta reducción en la producción de ascosporas del 58% respectivamente 50% comparada con el tratamiento de control fue significativa desde el punto de vista estadístico. El efecto de *Cladosporium cladosporioides* R406 en la producción de ascosporas en la primavera después del tratamiento de hojas de manzano durante el verano anterior fue menos pronunciado y no fue significativo desde el punto de vista estadístico.

Se puede concluir que los tratamientos de verano de huertos durante el verano con el antagonista *Cladosporium cladosporioides* H39 y posiblemente también con *Cladosporium cladosporioides* R406 tiene un largo efecto duradero en la primavera siguiente en la producción de ascosporas por parte de *Venturia inaequalis*. Un número reducido de ascosporas producidas en hojas que sobrevivan el invierno dará como resultado una presión de inóculo inferior durante la estación primaria de infección de la sarna del manzano y por consiguiente un desarrollo más lento de la sarna del manzano al comienzo de la epidemia. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte que demuestra que los tratamientos de hojas jóvenes de manzano en desarrollo, altamente susceptibles de la sarna del manzano, con un antagonista tiene como resultado una producción de ascosporas significativamente inferior en las hojas tratadas en la siguiente temporada después de pasar el invierno.

12A

Ejemplo 6 efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la producción de esporas de varios patógenos

Objetivo

El objetivo de los experimentos posteriores fue evaluar el efecto del antagonista en varios otros patógenos de plantas.

Materiales y métodos

Conidios de *Cladosporium cladosporioides* H39. Los conidios de *Cladosporium cladosporioides* H39 fueron producidos en un sistema de fermentación estado sólido (SSF) por parte de PROPHYTA Biologischwer Pflanzenschutz GmbH, Alemania. Los conidios obtenidos fueron formulados como gránulos dispersables en agua. Para conservar la calidad del producto, el producto final fue almacenado a -20 °C. La viabilidad de los conidios secos se determinó en agar de extracto de malta (1 g de extracto de malta por litro -1 antes de comenzar los experimentos. Los conidios incubados durante 24 horas a 20 °C con tubos de germinación más largos que la mitad del diámetro mínimo de un conidio fueron considerados viables. Sesenta y cinco por ciento de los conidios fueron viables.

Patógenos. Los siguientes aislados de patógenos fueron usados en el estudio (con medio de crecimiento usadas para producción de esporas en paréntesis) : *nectria galligena* 780 (harina de avena agar; OA) que causa cancro en árboles frutales y pudrición de fruto, *stemphylium vesicarium* 350 (agar de harina de

avena, OA) que causa mancha marrón del peral y pudrición del fruto, *Botrytis aclada* 008 (OA), que causa pudrición del cuello de la cebolla, *Botrytis cinérea* 143(OA) que causa moho gris en varios cultivos, *Mycosphaerella fijiensis* 78 (agar de papa dextrosa; PDA), que causa Sigatoca negra en el banano, *Fusarium graminearum* 820 (PDA) que causa fusariosis de las espigas de los cereales, *Fusarium culmorum* 807 (PDA) que causa fusariosis de las espigas de los cereales y la *Alternaria Brassicola* 177 (PDA) que causa enfermedades en Brassiceae. Todos los hongos fueron incubados durante 14 días a 24 °C con 12 horas en oscuridad por día. Para obtener suspensiones de esporas, los cultivos fueron inundados con agua de grifo estéril que contenía Tween 80 al 0.01%. Después de frotar suavemente con una espátula de caucho para remover las esporas de los cultivos fúngicos se filtraron las suspensiones por medio de gaza de nylon estéril con una malla de 200 µm. Las concentraciones de las suspensiones de esporas se determinaron con la ayuda de un hemocitómetro y se ajustaron con agua que contenía 0.01% (v/v) de Tween 80 a 1×10^2 esporas ml⁻¹ y 1×10^3 esporas por ml⁻¹. Para experimentos con *Mycosphaerella fijiensis* también se incluyeron en las suspensiones los fragmentos de micelio, obtenidos luego de moler la masa micélica en condiciones estériles. Solo se consideraron los fragmentos de micelios con más de tres células cuando se ajustó la concentración de las suspensiones.

Diseño del experimento. Se realizaron experimentos separados para cada patógeno y tipo de sustrato y se repitió cada experimento. Se quitaron las hojas verdes asintomáticas de pera, cebolla, rosal, ciclamen, Pelargonium, banano y col

blanca de las plantas sembradas en campo o invernadero, y las hojas desprendidas se secaron durante varios días a temperatura ambiente. Las hojas secas fueron cortadas en segmentos con un tamaño de aproximadamente 2x2 cm de largo, sellados en bolsas plásticas y esterilizados mediante radiación gamma de 40 kiloGray. Segmentos de 4 cm de largo de paja de trigo (con 1 nodo) y de ramitas de manzano (con 1 rama) fueron procesados de la misma manera.

Los segmentos de hojas, pajas o ramitas para uso en bioensayos fueron lavados con agua de grifo estéril para remover nutrientes solubles. Por consiguiente, aproximadamente 80 segmentos de cada tipo de sustrato fueron puestos en alícuotas de agua de grifo estéril contenidas en matraces cónicos de 250 ml durante la noche a 4 °C. Después de eso, los segmentos fueron secados con papel de filtro esterilizado. Se colocaron cuatro segmentos en cada una de las series de cámaras húmedas. Cada cámara contó de una caja de Petri plástica estéril (90 mm de diámetro) que contenía dos papeles de filtro estéril (85 mm de diámetro) y 6 ml de agua de grifo estéril. En cada experimento se aplicaron cinco replicaciones (cajas de Petri) para los tratamientos con el antagonista *Cladosporium cladosporioides* H39 y se aplicaron cinco réplicas para el control del agua en cada uno de los niveles de aplicación de patógenos (1×10^2 esporas ml⁻¹ y 1×10^3 esporas ml⁻¹). Durante el experimento, las cajas de Petri fueron dispuestas en un diseño completamente aleatorio.

Las suspensiones de esporas (o fragmentos micélicos en un caso) de patógenos fueron rociadas en los segmentos de hojas, pajas o ramitas en las cámaras

húmedas. *Nectria galligena* se aplicó en los segmentos de ramitas de manzana, *stemphylium vesicarium* en los segmentos de hoja del peral, *Botrytis aclada* en los segmentos de hoja de cebolla, *Botrytis cinérea* en los segmentos de hoja del rosal, ciclamen y *Perlagonium*, *Mycosphaerella fijiensis* en segmentos de hoja del banano, *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum* en segmentos de paja, y *Alternaria Brassicola* en segmentos de hojas de la col blanca. Los segmentos de tejido tratados fueron incubados a 24 °C durante 18 horas. Inmediatamente después del primer periodo de incubación, las suspensiones de esporas de *Cladosporium cladosporioides* H39 (2×10^6 esporas vitales ml^{-1}), o agua, fueron rociados en los segmentos. Los patógenos y antagonistas fueron aplicados con rociadores estériles a aproximadamente 5 ul cm^{-2} segmento de hoja. Después de eso, las hojas fueron adicionalmente incubadas a 24 °C en la oscuridad en las cámaras húmedas. Los segmentos de paja con *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum* fueron incubados desde el día 8 hasta el día 13 con 12 horas de oscuridad por día. Las ramitas con *nectria galligena* fueron incubadas desde el día 12 hasta el día 14 con 12 horas de oscuridad por día. Después de un periodo de incubación total de 9 días para *Botrytis aclada* y *Alternaria Brassicola* y 12 días para *Botrytis cinérea* (contado a partir del día en que los patógenos fueron aplicados), se estimó el área de superficie de los segmentos de hoja cubiertos con conidioporas de *Botrytis aclada* y *Alternaria Brassicola* y *Botrytis cinérea* usando clases de cero a cinco, que representaban respectivamente 0%, 1-5%, >5 – 25%, > 25 -50%, >50 -75% y >75 -100% . De la superficie de hoja cubierta con estructuras de los patógenos productoras de esporas (Kohl et al.1995, European

Journal of Plant Pathology 101, 627-637). En el caso de *Stemphylium vesicarium*, no se produjeron conidioporos, pero la etapa perfecta (*Pleospora allii*) produjo abundantes pseudotecios. El cubrimiento de la superficie de la hoja con pseudotecios fue estimado 16 días después de la inoculación usándolas mismas clases usadas en el cubrimiento con conidióforos. A partir del número de segmentos de hoja de cada clase (n 0-5) se calculó un índice de esporulación (IE) que iba de cero a cien por cada replicación (caja de Petri) consistente en cuatro segmentos de hoja ($SI = (0 \times n_0 + 5 \times n_1 + 25 \times n_2 + 50 \times n_3 + 75 \times n_4 + 100 \times n_5) / 4$). El número de colonias producido por *Mycosphaerella fijiensis* en los segmentos de hoja de banano fue contado después de un periodo de incubación de 15 días. El número de conidios de *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum* producido en los segmentos de paja después de 13 días fue contado usando un microscopio. Por consiguiente, los segmentos de paja de cada caja de Petri fueron puestos en un Erlenmeyer (100 ml) que contenía 10 ml de un líquido para lavar (20% etanol en agua de grifo que contenía 0.01 % de Tween 80). Los matraces fueron agitados en un agitador recíproco durante 10 minutos, y la concentración de conidios en las suspensiones se determinó mediante el microscopio para *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum* usando un hemocitómetro. El mismo método fue usado para cuantificar el número de conidios de *Nectria galligena* en los segmentos de ramita de manzano después de un periodo de incubación de 14 días.

Estadísticas

Los datos fueron analizados por separado para cada experimento por medio de ANOVA seguido de prueba LSD . Si las interacciones de tratamiento antagonistas concentración de patógenos no fueron significativas, el efecto medio de tratamiento antagonista es analizado como efecto principal. Los datos de los conteos de esporas fueron transformados a logaritmos naturales antes del análisis: $\log\text{-número de esporas} = \log_{10}(\text{numero de esporas} + 0.01)$.

Resultados y análisis

***Nectria galligena*.** Se encontró un fuerte efecto antagonista de *Cladosporium cladosporioides* H39 en contra de *nectria galligena* ,el cual causa cancro en árboles frutales y pudrición del fruto. En huertos, el patógeno sobrevive y se multiplica en áreas de herida infectada (cancros) de ramitas (McCracken et al.,2003, Plant Pathology 52, 553-566). El inoculo producido en los bioensayos en dichos tejidos bajo condiciones controladas fue reducido por el antagonista en más el 99 % (Tabla 10).

Los resultados muestran que el *Cladosporium cladosporioides* H39 tiene un alto potencial de uso en biocontrol de cancro de árboles frutales el cual es además de la sarna del manzano la enfermedad más importante en la producción de manzano y peral. Las aplicaciones tienen, por lo tanto, el potencial para controlar ambas enfermedades, la sarna del manzano así como el cancro de árboles frutales, en los principales cultivos de frutas de tipo pomo.

***Stemphylium vesicarium*.** *Stemphylium vesicarium* esta causándola mancha marrón del peral en las áreas más importantes de producción de pera en Europa

(Llorente & Montesinos, 2006). La principal fuente de inóculo primario de la enfermedad son las hojas de pera necróticas que pasan el invierno en las cuales se producen pseudotecios de la etapa perfecta (*Pleospora allii*).

Las aplicaciones de *Cladosporium cladosporioides* H39 en hojas necróticas, precolonizadas por el patógeno, redujeron significativamente la formación de pseudotecios (estimado mediante valoración del cubrimiento de la superficie de la hoja por los cuerpos fructíferos) en ambos experimentos (Tabla 11). El control biológico de la mancha marrón por el *Cladosporium cladosporioides* H39 puede, por consiguiente, lograrse mediante aplicaciones del antagonista a la copa o al piso del huerto después de la caída de hojas.

Stemphylium vesicarium fue aplicado en una concentración de 1×10^2 esporas ml^{-1} y 1×10^3 esporas ml^{-1} 18 horas antes de que se aplicara H39 con 2×10^6 esporas ml^{-1} . La media de 5 réplicas, cada uno con cuatro segmentos de hoja; se estimó el cubrimiento de superficie de hoja con pseudotecios. Significativamente diferente al tratamiento de control pruebas LSD ($\alpha=0.05$).

Botrytis spp. La presencia de tejidos hospedantes necróticos es un prerrequisito para las epidemias de moho gris y otras enfermedades causadas por *Botrytis spp.* Se ha demostrado que la exclusión competitiva de *Botrytis spp.* de los tejidos hospedantes necróticos puede ser explotarse para biocontrol de enfermedades incitadas por *Botrytis* (Kohl et al., 2003, Biocontrol 48, 349-359).

Cladosporium cladosporioides H39 redujo significativamente la esporulación de *Botrytis aclada* y *Botrytis cinerea* en bio ensayos en tejidos de todos los cuatro

hospedantes diferentes probados (Tablas 12 a 15). De este modo, El antagonista tiene potencial para control biológico de enfermedades incitadas por *Botrytis*.

***Mycosphaerella fijiensis*.** *Mycosphaerella fijiensis* está causando la cigatoca negra en el banano (Arzanlou et al., 2007, Phytopathology 97, 112-118). La enfermedad es la principal amenaza en la producción de banano. El control de enfermedades en la actualidad depende de múltiples aplicaciones de fungicidas. El patógeno sobrevive y se multiplica en lesiones necróticas en las hojas.

Los resultados el bioensayo en las hojas necróticas del banano muestran que el antagonista *Cladosporium cladosporioides* H39 tiene un potencial prometedor para el control biológico de la enfermedad. Aunque las esporas no fueron formadas por el patógeno bajo las condiciones experimentales, se pudo demostrar claramente que el antagonista es capaz de excluir al patógeno de la colonización del sustrato (Tabla 16).

***Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum*.** *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum* están causando la fusariosis en los cereales y en el maíz. La enfermedad está causando pérdidas en las cosechas y a menudo, lo que es más importante, una grave pérdida de calidad debido a la formación de micotoxinas por parte de los patógenos. Los rastrojos de paja y otros residuos son la principal fuente de inóculo de la enfermedad (Osborne & Stein, 2007, International Journal of Food Microbiology 119, 103-108).

Cladosporium cladosporioides H39 redujo significativamente la producción de conidios de ambos *Fusarium* spp. En los segmentos de paja precolonizados por

los patógenos (Tabla 17 y 18) y por consiguiente, tiene el potencial para uso en biocontrol de estos importantes patógenos en la producción de cereales.

Alternaria Brassicicola. La mancha negra de hoja causada por *Alternaria Brassicicola* es una enfermedad grave de Brassiceae en la producción de vegetales. El patógeno esporula dentro de las lesiones necróticas infectadas y los restos de cultivos (Humpherson-Jones, 1939, Annals of Applied Biology 115, 45-50). Además de las hojas, la semilla entera así como las vainas incluyendo las semillas en desarrollo en los campos de producción de semillas pueden ser dañadas.

Se encontró una reducción bastante significativa de la producción de conidios de *Alternaria Brassicicola* en los bioensayos después de la aplicación de *Cladosporium cladosporioides* H39 a las hojas necróticas precolonizadas de la col blanca (Tabla 19).

Ejemplo 7. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la pudrición del fruto del manzano

Objetivo

El objetivo de un experimento posterior fue evaluar el efecto del antagonista en *Monilla fructigena* causando pudrición poscosecha en el manzano.

Material y métodos

136

***Cladosporium cladosporioides* H39.** Los conidios de *Cladosporium cladosporioides* H39 fueron producidos así como en el ejemplo 6

Patógeno. Monilla fructigena 1067., que causa la pudrición de la fruta en varios cultivos de frutas, fue sembrado en agar de harina de avena durante 14 días a 24 °C con 12 horas de oscuridad por día. Para obtener suspensiones de esporas, los cultivos fueron inundados con agua de grifo estéril que contenía 0.012 de Tween 80. Después de frotar suavemente con una espátula de caucho para remover las esporas de los cultivos fúngicos se filtraron las suspensiones por medio de gaza de nylon estéril con una malla de 200 μm . Ya que la esporulación fue escasa, se incluyeron en las suspensiones los fragmentos de micelios, obtenidos después del pulido estéril de la masa micélica. Solo los fragmentos micélicos con más de tres células fueron considerados cuando la concentración de las suspensiones fue determinada con la ayuda de un hemocitómetro y se ajustaron con agua de grifo estéril que contenía 0.0015 Tween 80 a 1×10^2 esporas y fragmentos micélicos por ml^{-1} y 1×10^3 esporas fragmentos micélicos ml^{-1} .

Diseño del experimento

Las manzanas asintomáticas producidas orgánicamente cv Elstar fueron usadas en los bioensayos. Las manzanas fueron esterilizadas en la superficie

1307

sumergiéndolas en 70% etanol durante 1 minuto y enjuagándolas 3 veces en agua de grifo estéril. Cuatro manzanas fueron colocadas dentro de cámaras húmedas (28x 15 x 9 cm; con papel de filtro humedecido en el fondo; cerrado con tapa) y se hicieron dos heridas (aproximadamente 3mm de diámetro y 5 mm de profundidad) usando pinzas estériles (Jijakli & Lepoivre, 1992, In: Fokkema, N.J., J. Kohl & Y. Elad, Biological control of foliar and post-harvest diseases, IOBC/WPRS Bulletin Vol. 16(11), pp. 106-110.) Cincuenta μ l de agua estéril fueron aplicados en las heridas de los tratamientos de control. En otro tratamiento, 50 μ l de una suspensión conidial de *Cladosporium cladosporioides* H39 (2×10^6 esporas vitales ml^{-1}) fueron agregadas a cada herida. Las manzanas tratadas fueron incubadas a 24 °C durante 24 horas. Posteriormente, las manzanas fueron tratadas con suspensiones de esporas y fragmentos micélicos de *Monilla fructigena* y fueron adicionalmente incubadas en las cámaras húmedas en 24 °C. Cada tratamiento fue realizado en 5 réplicas y cada replica constó de 4 manzanas en la misma cámara húmeda, y se dispusieron cámaras húmedas con varios tratamientos en un diseño completamente aleatorio. El experimento se repitió dos veces. Se midió el diámetro de las lesiones que se desarrollaron a partir de la heridas inoculadas 8 y 12 días después de la aplicación de *Monilla fructigena*.

Resultados y análisis

Monilla fructigena causó pudrición grave de la fruta en heridas de frutos de manzano bajo las condiciones experimentales, por ejemplo, se produjeron

lesiones en el tratamiento de control de ambos experimentos en todas las heridas en el nivel alto de patógeno. La aplicación de conidios de *Cladosporium cladosporioides* H39 redujo el número de heridas infectadas en la mayoría de los casos (Tabla 20a). El tamaño promedio de la lesión fue reducido por los tratamientos antagonistas hasta en un 70% (Tabla 20 b). En promedio, la pudrición de la fruta (medida como el tamaño de la lesión) se redujo significativamente desde el punto de vista estadístico en un 50% en el primer experimento, y en un 30 % en el segundo experimento.

Los resultados demuestran que las aplicaciones de *Cladosporium cladosporioides* H39 durante la tiempo de desarrollo de la planta tiene el potencial de proteger los frutos de manzano de la pudrición de fruto precosecha y poscosecha causada por *Monilla fructigena*. Además, los tratamientos poscosecha con *Cladosporium cladosporioides* H39 son prometedores en cuanto a proteger el fruto de la pudrición poscosecha durante el almacenamiento.

versión 23 de Abril de 2006

Tabla 1. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en la producción de conidios de *Venturia inaequalis* en semilleros de manzana bajo condiciones controladas. En total, 63 hongos aislados fueron examinados en 14 experimentos. Solo los resultados de los aislados que presentan promesas son presentados.

		Número de conidios por cm ⁻² a			
Tratamiento		Experimento			
		1 (n=8) b	3 (n=9)	9 (n=10)	10 11 13 14
Número de tratamientos	8	9	10	10	10 10 10 11
Hojas más jóvenes					
Control	1339	4915	1960	2393	4183 728 1480
<i>C. cladosporioides</i>	-	-	-	-	863* 330 (55) 572 (61)

139

H39	(79)						
Hojas más viejas							
Control	-	-	331	359	1313	144	614
C. cladosporioides	-	-	-	-	354*	116 (19)	162*
H39					(73)	(74)	

^a Valores transformados en reverso; eficacia relativa al tratamiento de control en parentesis.

^b Número total de tratamientos.

^c Estadísticamente diferente al tratamiento de control.

^d No examinado.

En los experimentos 1 y 3, las 4 hojas más jóvenes por semillero fueron tenidas en cuenta; en otros experimentos, la hoja más joven fue muestreada por separado de las otras 3 hojas siguientes.

170

Tabla 2A. Efecto de la aplicación de *Phoma pinodella* H3, *Coniothyrium cereale* H33, *Cladosporium* sp. H35 y *Cladosporium cladosporioides* H39 en la producción de conidios de *Venturia inaequalis* bajo condiciones de huerto. Experimentos 1, 5, y 6.

5

Tratamiento	Ln-Número de conidios por cm ²					
	Experimento					Promedio
	1	5	6			
Hojas más jóvenes						
Control	9.5 (12.8)	10.1 (24.9)	9.8 (18.0)	9.8 (18.0)	9.8 (18.0)	
C. cladosporioides H39	9.1 (8.6)	10.7 (46.1)	10.7 (42.5)	10.2 (26.9)	10.2 (26.9)	
C. cladosporioides H39 formulado, bajo viabilidad	-	10.4 (32.4)	10.4 (31.8)	10.4 (32.9)	10.4 (32.9)	
Hojas más viejas						

141

Control	9.2 (9.5)	9.2 (9.6)	9.3 (10.4)	9.2 (9.9)
C. cladosporioides H39	9.5 (12.9)	10.2 (26.1)	9.7 (16.1)	9.8 (18.0)
C. cladosporioides H39 formulado, bajo Viabilidad	-	9.3 (11.0)	9.7 (16.1)	9.5 (13.3)

^a Valores transformados en reverso x 1000 en parentesis.

Tabla 2. B Efecto de la aplicación de *Phoma pinodella* H3, *Coniothyrium cereale* H33, *Cladosporium* sp. H35 y *Cladosporium cladosporioides* H39 en la producción de conidios de *Venturia inaequalis* bajo condiciones de huerto. Experimentos 2, 3, 4, 7, y 8.

Ln-Número de conidios por cm^{-2} a						
Tratamiento	Experimento	2	3	4	7	8
Hojas más jóvenes						
Control		8.2 (3.6)	7.6 (2.1)	10.7 (46.3)	11.8 (132.1)	12.3 (227.3)
						10.1 (25.3)
<i>C. cladosporioides</i> H39		8.9 (6.9)	7.9 (2.7)	10.2 (25.8)	12.4 (253.8)	12.1 (183.5)
						10.3 (29.5)
<i>C. cladosporioides</i> H39		7.4 (1.6)	6.9 (0.9)	10.4 (31.7)	11.4 (90.4)	11.9 (147.2)
						9.6* (14.6)

143

formulado										
Hojas más viejas										
Control	10.6	(40.3)	9.2	(12.3)	9.2	(9.8)	11.2	11.8	10.4	(33.0)
							(72.8)	(132.1)		
<i>C. cladosporioides</i> H39	10.5	(35.3)	8.9	(7.5)	8.7	(5.8)	11.4	11.9	10.3	(27.6)
							(93.4)	(145.7)		
<i>C. cladosporioides</i> H39	10.0	(21.3)	8.6	(5.5)	8.8	(6.6)	10.9	11.4	9.9*	(20.5)
							(52.3)	(90.7)		
formulado										

^a Valores transformados en reverso x 1000 en parentesis.

^b Estadísticamente diferente al tratamiento de control.

144

45

versión 28 de Abril de 2006

Tabla 3. Fechas de aplicación y germinación de esporas de inoculo aplicado de H39 y R406 (como se estima contando desde 1 placa de agar rociada en el huerto).

Fecha de aplicación	Germinación de esporas (%)	
	H39	R406
Junio 28	76	-
Julio 2	26	-
Julio 5	47	-
Julio 9	-	-
Julio 12	28	96
Julio 16	32	97
Julio 19	28	95
Julio 23	19	97
Julio 26	26	94
Julio 30	23	96
Agosto 2	16	97
Agosto 6	11	90
Agosto 9	4	96
Agosto 13	4	95
Agosto 16	10	95
Agosto 20	4	73

746

Tabla 4. Colonización de epifitas en hojas de manzana muestreadas el 4 de octubre de 2007. Las hojas han sido tratadas dos veces por semana desde el 28 de junio hasta el 20 de agosto con H39 y V301.61 (16 aplicaciones en total) o desde el 12 de julio hasta el 20 de agosto con R406 (12 aplicaciones en total).

5

Tratamiento	Número de CFU por cm ² en superficie de hoja (transformado reverso)		
	Hongo Hyphal		Levaduras
	<i>Cladosporium</i> spp.	diferente al <i>Cladosporium</i> spp.	
Control	1005	1285	397 a ¹
H39	2223	1042	152 b
R406	502	400	100 b
	(F _{prob} =0.076)	(F _{prob} =0.069)	

¹ Valores de la misma columna con letras en común no difieren significativamente en estadística (LSD; α = 0.05).

10

Tabla 5. Colonización endofítica de hojas de manzana muestreadas el 4 de octubre de 2007. Las hojas han sido tratadas dos veces por semana desde el 28 de junio hasta el 20 de agosto con H39 y V301.61 (16 aplicaciones en total) o desde el 12 de julio hasta el 20 de agosto con R406 (12 aplicaciones en total).

15

Tratamiento	Número de CFU por cm ² en superficie de hoja (transformado reverso)		
	Hongo Hyphal		
	<i>Cladosporium</i> spp.	diferente al <i>Cladosporium</i> spp.	Levaduras
Control	1.19 b ¹	4.97	1.95
H39	1.66 a	2.72	3.75
R406	1.20 b	2.93	1.99
		(F _{prob} =0.182)	(F _{prob} =0.171)

¹ Valores de la misma columna con letras en común no difieren significativamente en estadística (LSD; α = 0.05).

5

Tabla 6. Efectos de aplicación rociada del R406 antagonista en hojas de manzana en el otoño de 2005 en contenido de DNA de *V. inaequalis* en primavera como se determina en tiempo-real especies-especifico PCR (TaqMan-PCR). Los residuos de hojas fueron muestreados del 23 al 31 de enero de 2006.

10

Tratamiento	pg DNA de <i>V. inaequalis</i>	
	por mg de peso seco de	en residuos de 80 hojas
	residuos de hoja	
Control	372	10093
R406	226	5007 * ¹

¹ Estadísticamente es significativamente diferente de los tratamientos de control (LSD_{5%} = 5057).

5 Tabla 7. Efectos de aplicación rociada del R406 antagonista en hojas de manzana en el otoño de 2005 en *V. inaequalis* producción de ascospora en residuos de hojas de 80 hojas en primavera de 2006.

Tratamiento	Número de acosporas por cada 80 hojas		
	Transformado- Log ₁₀	Transformado- reverso	Relativo a control ¹
Control	5.88	749894	100
R406	5.37 * ²	235505	31

10 ¹ En escala de transformación reversa

² Estadísticamente es significativamente diferente de los tratamientos de control (LSD_{5%} = 0.3604).



15 Tabla 8. Efectos de aplicación rociada del R406 antagonista en hojas de manzana en el otoño de 2005 en *V. inaequalis* producción de ascospora por gramo de residuos de hojas en primavera de 2006.

Tratamiento	Número de acosporas por g de residuo de hojas		
	Transformado- Log ₁₀	Transformado- reverso	Relativo a control ¹
Control	4.54	34316	100

R406 4.07 * ² 11722 34

¹ En escala de transformación reversa

² Estadísticamente es significativamente diferente de los tratamientos de control (LSD_{5%} = 0.3183).

5

Tabla 9. Efecto de tratamiento de hojas jóvenes con *Cladosporium cladosporioides* H39 y R406 llevado a cabo durante el verano entre el 28 de junio y el 20 de agosto en producción de ascosporas de *Venturia inaequalis* en hojas tratadas después de sobre-invierno en el piso del huerto. Experimento de huerto 2007/2008.

10

Tratamiento	Número-Log de ascosporas g ⁻¹ de			
	muestra original de hojas		residuos de hojas en	
	(peso fresco)		primavera (peso seco)	
Control	4.57	(37,171) ^a	5.34	(220,089)
H39	4.20 * ^b	(15,733)	5.04 *	(109,044)
R406	4.52	(32,991)	5.32	(211,203)

^a Valores de transformación reversa

^b Significativamente diferente de los tratamientos de control (un-lado prueba-LSD; α = 0.05).

15

Tabla 10. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en esporulación de *Nectria galligena* en segmentos de ramitas de manzana incubados en cámara húmeda a 24°C por 14 días.

Número log de conidios por segmento de ramita ¹			
Tratamiento	1x10 ² esporas	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Promedio
	ml ⁻¹	1	
Experimento 1			
Control de	6.64	6.56	6.60 (3,981,100)
agua	(4,365,200)	(3,630,800)	
H39	3.76	3.06	3.41 * ² (2,600)
	(5,800)	(1,100)	
Experimento 2			
Control de	6.59	6.75	6.67 (4,666,600)
agua	(3,881,500)	(562,300)	
H39	4.32	4.44	4.38 * (23,800)
	(20,900)	(27,200)	

Nectria galligena fue aplicada en una concentración de 1 · 10² esporas ml⁻¹ y 1 · 10³ esporas ml⁻¹ 18 horas antes de aplicar el H39 con 2x10⁶ esporas · ml⁻¹.

¹ Promedio de 5 replicas, cada una con 4 segmentos de ramita; valores de transformación reversa en parentesis.

² Significativamente diferente de los tratamientos de control (prueba-LSD; α = 0.05).

LSI

Tabla 11. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en esporulación de *Pleospora allii* (*Stemphylium vesicarium*) en hojas de pera necróticas incubadas en cámara húmeda a 24°C por 16 días.

Índice de esporulación de <i>Pleospora allii</i> ¹			
Tratamiento	1x10 ² esporas	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Promedio
	ml ⁻¹	1	
Experimento 1			
Control de agua	29.5	36.8	33.1
H39	8.2	26.8	17.5 * ²
Experimento 2			
Control de agua	49.0	48.2	48.9
H39	11.5	18.2	14.9 * ²

5

Tabla 12. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en esporulación de *Botrytis aclada* en hojas de cebolla necróticas incubadas en cámara húmeda a 24°C por 9 días.

Índice de esporulación de <i>Botrytis aclada</i> ¹			
Tratamiento	1x10 ² esporas	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Promedio
	ml ⁻¹	1	
Experimento 1			
Control de agua	93.8	98.8	96.2

10

H39	10.0	12.0	11.0 * ²
Experimento 2			
Control de			
agua	92.5	83.0	87.8
H39	8.8	18.0	13.4 *

Botrytis aclada fue aplicada en una concentración de 1x10² esporas ml⁻¹ y 1x10³ esporas ml⁻¹ 18 horas antes de aplicar el H39 con 2x10⁶ esporas ml⁻¹.

¹ Promedio de 5 replicas, cada una con 4 segmentos de hoja.

² Significativamente diferente de los tratamientos de control (prueba-LSD; α = 0.05).

Tabla 13. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en esporulación de *Botrytis cinerea* en hojas de rosa necróticas incubadas en cámara húmeda a 24°C por 12 días.

Tratamiento	Índice de esporulación de <i>Botrytis cinerea</i> ¹		
	1x10 ² esporas ml ⁻¹	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Promedio
		1	
Experimento 1			
Control de			
agua	76.2	85.0	80.6
H39	17.5	43.0	30.2 * ²
Experimento 2			
Control de			
agua	61.5	96.2	78.9

H39	35.8	85.0	60.4 *
-----	------	------	--------

Botrytis cinerea fue aplicada en una concentración de 1×10^2 esporas ml^{-1} y 1×10^3 esporas ml^{-1} 18 horas antes de aplicar el H39 con 2×10^6 esporas ml^{-1} .

¹ Promedio de 5 replicas, cada una con 4 segmentos de hoja.

5 ² Significativamente diferente de los tratamientos de control (prueba-LSD; $\alpha = 0.05$).

10 Tabla 14. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en esporulación de *Botrytis cinerea* en hojas de violeta de los alpes necróticas incubadas en cámara húmeda a 24°C por 12 días.

Tratamiento	Indice de esporulación de <i>Botrytis cinerea</i> ¹	
	1×10^2 esporas ml^{-1}	1×10^3 esporas ml^{-1}
Experimento 1		
Control de agua	95.0	95.0
H39	28.2 * ²	66.5 *
Experimento 2		
Control de agua	95.0	90.0
H39	57.8 *	95.5

15 *Botrytis cinerea* fue aplicada en una concentración de 1×10^2 esporas ml^{-1} y 1×10^3 esporas ml^{-1} 18 horas antes de aplicar el H39 con 2×10^6 esporas ml^{-1} .

¹ Promedio de 5 replicas, cada una con 4 segmentos de hoja.

² Significativamente diferente de los tratamientos de control (prueba-LSD; $\alpha = 0.05$).

Tabla 15. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en esporulación de *Botrytis cinerea* en hojas de Geranios necróticas incubadas en cámara húmeda a 24°C por 12 días.

Índice de esporulación de <i>Botrytis cinerea</i> ¹			
Tratamiento	1x10 ² esporas	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Promedio
	ml ⁻¹	1	
Experimento 1			
Control de agua	34.8	42.0	38.4
H39	1.5	8.5	5.0 * ²
Experimento 2			
Control de agua	24.5	23.2	23.9
H39	0.2	11.0	5.6 *

Botrytis cinerea fue aplicada en una concentración de 1x10² esporas ml⁻¹ y 1x10³ esporas ml⁻¹ 18 horas antes de aplicar el H39 con 2x10⁶ esporas ml⁻¹.

¹ Promedio de 5 replicas, cada una con 4 segmentos de hoja.
² Significativamente diferente de los tratamientos de control (prueba-LSD; α = 0.05).

Tabla 16. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en esporulación de *Mycosphaerella fijiensis* en hojas de banano necróticas incubadas en cámara húmeda a 24°C por 15 días.

Tratamiento	Número de colonias de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> por segmento de hojas ¹	
Experimento 1		
Control de agua		5.65
H39		0.15 * ²
Experimento 2		
Control de agua		10.15
H39		0.00 *

Mycosphaerella fijiensis fue aplicada en una concentración de 1x10³ fragmentos de micelio ml⁻¹ 18 horas antes de aplicar el H39 con 2x10⁶ esporas ml⁻¹.

- 5
- ¹ Promedio de 5 replicas, cada una con 4 segmentos de hoja.

² Significativamente diferente de los tratamientos de control (prueba-LSD; α = 0.05).

10



Tabla 17. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en esporulación de *Fusarium graminearum* en paja de trigo incubadas en cámara húmeda a 24°C por 13 días.

	Número log de conidios por segmento de paja ¹			
Tratamiento	1x10 ² esporas ml ⁻¹		1x10 ³ esporas ml ⁻¹	
Experimento 1				
Control de agua	5.615	(412,100)	5.731	(538,300)
H39	4.759 ^{*2}	(57,400)	5.501	(317,000)
Experimento 2				

Control de agua	5.872	(744,700)	5.885	(767,400)
H39	5.416 *	(260,600)	5.670 *	(467,700)

Fusarium graminearum fue aplicada en una concentración de 1x10² esporas ml⁻¹ y 1x10³ esporas ml⁻¹ 18 horas antes de aplicar el H39 con 2x10⁶ esporas ml⁻¹.

- 5
- ¹ Promedio de 5 replicas, cada una con 4 segmentos de paja; valores de transformación reversa en parentesis.

² Significativamente diferente de los tratamientos de control (prueba-LSD; α = 0,05).

10

Tabla 18. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en esporulación de *Fusarium culmorum* en paja de trigo incubadas en cámara húmeda a 24°C por 13 días.

Tratamiento	Número log de conidios por segmento de paja ¹		
	1x10 ² esporas ml ⁻¹	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Promedio
	1		
Experimento 1			
Control de	6.496	6.614	6.555
agua	(3,133,290)	(4,111,500)	(3,589,200)
H39	6.092	6.390	6.241 ^{*2}
	(1,235,900)	(2,454,700)	(1,741,800)
Experimento 2			
Control de	6.446	6.521	6.484
agua	(2,792,500)	(3,318,900)	(3,047,900)

	6.222	6.413	6.317 *
H39	(1,667,200)	(2,588,200)	(2,074,900)

Fusarium culmorum fue aplicado en una concentración de 1×10^2 esporas ml^{-1} y 1×10^3 esporas ml^{-1} 18 horas antes de aplicar el H39 con 2×10^6 esporas ml^{-1} .

- 5
- ¹ Promedio de 5 replicas, cada una con 4 segmentos de paja; valores de transformación reversa en parentesis.

² Significativamente diferente de los tratamientos de control (prueba-LSD; $\alpha = 0.05$).

10

Tabla 19. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en esporulación de *Alternaria brassicicola* en hojas de repollo blanco necróticas incubadas en cámara húmeda a 24°C por 9 días.

Indice de esporulación de <i>Alternaria brassicicola</i> ¹			
Tratamiento	1x10 ² esporas	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Promedio
	ml ⁻¹	1	
Experimento 1			
Control de agua	72.5	80.0	76.2
H39	2.5	23.2	12.9 * ²
Experimento 2			
Control de agua	78.8	87.5	
H39	11.5 *	41.8 *	

Alternaria brassicicola fue aplicada en una concentración de 1×10^2 esporas ml^{-1} y 1×10^3 esporas ml^{-1} 18 horas antes de aplicar el H39 con 2×10^6 esporas ml^{-1} .

- 5
- ¹ Promedio de 5 replicas, cada una con 4 segmentos de hoja.

² Significativamente diferente de los tratamientos de control (prueba-LSD; $\alpha = 0.05$).

10

Tabla 20. Efecto de *Cladosporium cladosporioides* H39 en pudrición de fruta causada por *Monilia fructigena* en manzanas cv Elstar incubadas en cámara húmeda a 24°C por 8 y 12 días.

a. Número de lesiones producidas por cada 8 heridas.

15

Tratamiento	Número de lesiones ¹		
	1x10 ² esporas	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Promedio
	ml ⁻¹	1	
Día 8			
Control de agua	4.8	8.0	6.4
H39	1.8	6.6	4.2 * ²
Día 12			
Control de agua	8.0	6.4	7.2
H39	7.4	5.4	6.4

b. Promedio de diámetro de la lesión.

Tratamiento	Diámetro de la lesión (mm) ¹		
	1x10 ² esporas	1x10 ³ esporas ml ⁻¹	Promedio
	ml ⁻¹	1	
Día 8			
Control de agua	19.0	43.1	31.1
H39	5.6	24.7	15.2 * ²
Día 12			
Control de agua	53.3	85.7	69.5
H39	31.1	66.2	48.6 *

- 5
- Cladosporium cladosporioides* H39 fue aplicada en heridas utilizando 50 µl de suspensión de esporas a 2x10⁶ esporas ml⁻¹. Después de 24 horas, *Monilia fructigena* fue aplicada utilizando de 50 µl suspensión a 1x10² esporas y fragmentos de micelio ml⁻¹ y 1x10³ esporas y fragmentos de micelio ml⁻¹.
- 10
- ¹ Promedio de 5 replicas, cada una con 4 manzanas con 2 heridas tratadas por manzana.

² Significativamente diferente de los tratamientos de control (prueba-LSD; α = 0.05).

160

Reivindicaciones

1. *Cladosporium cladosporioides* H39, como se consignó el el 13 de Diciembre de 2007 bajo el numero CBS 122244 con the Central Bureau Schimmelcultures, Baarn, Países bajos.
2. *Cladosporium cladosporioides* R406, como se consigna el 13 de Diciembre de 2007 bajo el numero CBS 122243 con the Central Bureau Schimmelcultures, Baarn, Países bajos.
3. Composición para controlar un fitopatógeno de hojas, frutos y espigas, que comprende un *Cladosporium* según reivindicaciones 1 y 2.
4. Composición según reivindicación 3, en la que dicho patógeno de plantas es seleccionado del grupo que conforman la sarna del manzano (*Venturia inaequalis*), la roña o moteado de la pera (*Venturia pirina*), manchas de la hoja (*Blumeriella jaapi*), mancha negra del rosál(*Diplocarpon rosae*/*Marsosonina rosae*), la mancha marrón del peral (*Stemphylium vesicarium*) , oídios de varias plantas tales como la fresa, las rosas y las manzanas (*Podosphaera leucotricha*/*Sphaerotheca pannosa*), oídio de la begonia (*Microsphaera begoniae*),oídio de la fresa (*Sphaerotheca macularis*), enfermedad del hollín (*Gloeodes pomigena*),mancha de mosca (*Zygophalia jamaicensis*),lepra del melocotonero o abolladura (*Taphrina deformans*), pudrición marrón, canero (*Monilla fructigena*),roya del peral

161

(*Gymnosporangium sabinae*), chancro (*Nectria galligena*), mancha negra del rosál (*Diplocarpon rosae*), roya del rosál (*Phragmidium tuberculatum/Phragmidium spp.*) *Botrytis spp.* En varias plantas, *Mycosphaerella brassicicola* in la col, *Mycosphaerella fijiensis* en el banano, *Alternaria spp.* in Brassica, papa and varias other plants, *Fusarium spp.* especially in cereals including maize, *Phytophthora infestans* of potato and *Plasmopara viticola* in vid, preferably wherein said fungal foliar pathogen is apple scab.

5. Una composición según reivindicaciones 3 y 4, en la que el *Cladosporium* está presente en forma de esporas.
6. Una composición según reivindicación 5, la cual comprende adicionalmente un portador para las esporas de *Cladosporium*, preferiblemente en las que dicho portador es glucosa.
7. Composición para controlar un fitopatógeno de hojas, frutos y espigas en la que un extracto de *Cladosporium* está presente según reivindicaciones 1 y 2.
8. Un método para controlar un patógeno en plantas, que comprende tratar dichas plantas con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 -8.

162

9. Un método según reivindicación 8, en la que dicha composición es rociada en las hojas, frutos o espigas de la planta.
10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en la que el control del patógeno comprende prevención de la infección o disminución del daño de la planta causado por dicho patógeno.
11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en la que dicho patógeno es seleccionado del grupo que conforman la sarna del manzano (*Venturia inaequalis*), la roña o moteado de la pera (*Venturia pirina*), manchas de la hoja (*Blumeriella jaapi*), mancha negra del rosál (*Diplocarpon rosae*/Marsosonina *rosae*), la mancha marrón del peral (*Stemphylium vesicarium*), oídios de varias plantas tales como la fresa, las rosas y las manzanas (*Podosphaera leucotricha*/*Sphaerotheca pannosa*), oídio de la begonia (*Microsphaera begoniae*), oídio de la fresa (*Sphaerotheca macularis*), enfermedad del hollín (*Gloeodes pomigena*), mancha de mosca (*Zygophiala jamaicensis*), lepra del melocotonero o abolladura (*Taphrina deformans*), pudrición marrón, cancro (*Monilla fructigena*), roya del peral (*Gymnosporangium sabinae*), chancro (*Nectria galligena*), mancha negra del rosál (*Diplocarpon rosae*), roya del rosál (*Phragmidium tuberculatum*/*Phragmidium spp.*) Botrytis spp. En varias plantas, *Mycosphaerella brassicicola* in la col, *Mycosphaerella fijiensis* en el banano, *Alternaria spp.* in Brassica, papa and varias other plants, *Fusarium spp.* especially in

cereals including maize, *Phytophthora infestans* of potato and *Plasmopara viticola* in vid, preferably wherein said fungal foliar pathogen is apple scab.

- 12.Un método según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en la que dicha composición es aplicada precosecha
- 13.Un método según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en la que dicha composición es aplicada poscosecha
- 14.Uso de un *Cladosporium* según la reivindicación 1 o 2, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-7 para la prevención o tratamiento de la infección de hojas, frutos, o espigas de una planta por parte de un patógeno.
- 15.Una cepa de *Cladosporium* según la reivindicación 1 o 2, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-7 para uso en el control de una infección por parte de un fitopatógeno.

164

Resumen

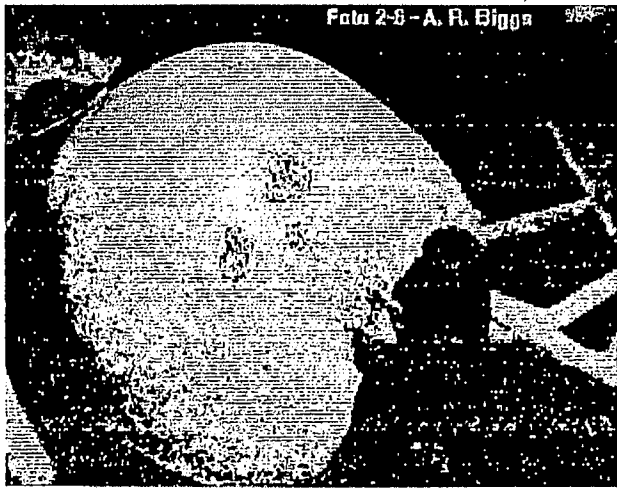
La invención se relaciona con el control de patógenos que causan enfermedades en las hojas, frutos y en plantas, tales como la sarna del manzano (*Venturia inaequalis*) mediante tratamiento de la planta con un aislado de *Cladosporium cladosporioides*. El tratamiento es efectivo tanto en la prevención como en el tratamiento de la infección fúngica

165-

Figura 1 A



B



166

Figura 2

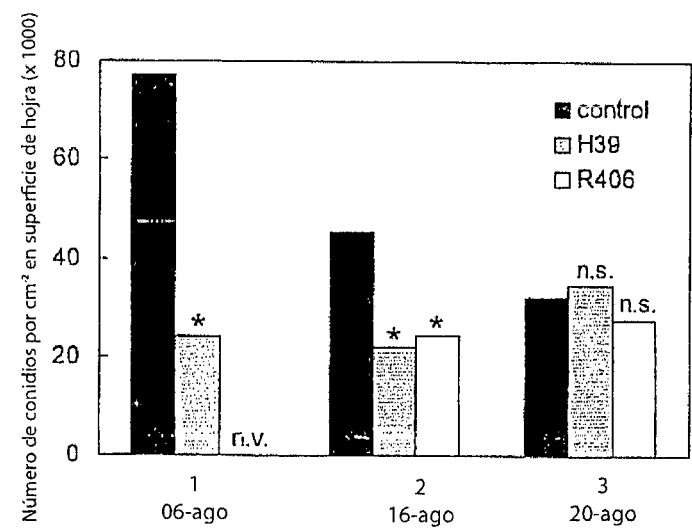
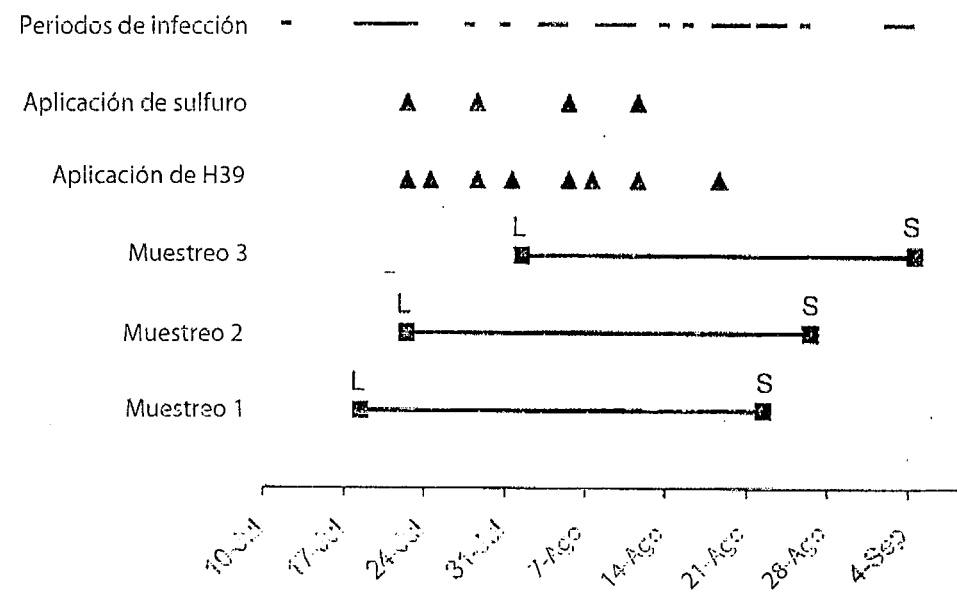


Figura 3



67

Figura 4

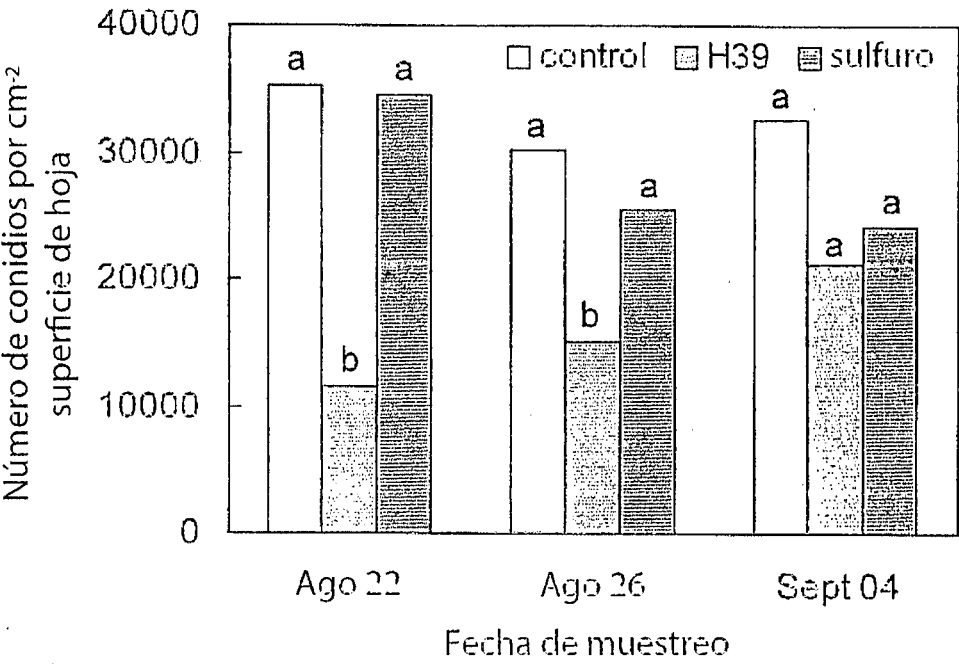
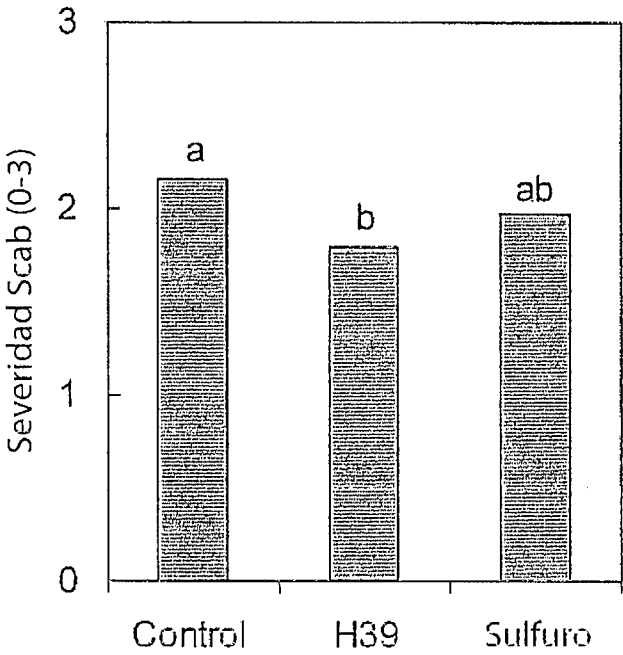


Figura 5



169

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2008/050794

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A01N63/04 C12P1/02		
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) C12R C12P 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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KÖHL J: "Replacement of Copper Fungicides in Organic Production of Grapevine and Apple in Europe"[Online] 12 November 2007 (2007-11-12), XP002520085 Retrieved from the Internet: URL: http://www.rep-co.nl/Documents/Fub1%20Executive%20Summaries/REPCO%20Final_executive_summary.pdf [retrieved on 2009-03-19] page 28, line 5 - page 31, line 10 ----- -/--	1-15
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* 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 *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 *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 such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 March 2009		Date of mailing of the international search report 02/04/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5013 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 240-2016		Authorized officer van de Kamp, Mart

✓A0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2008/050794

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KÖHL J: "Replacement of Copper Fungicides in Organic Production of Grapevine and Apple in Europe"[Online] 20 November 2006 (2006-11-20), XP002520086 Retrieved from the Internet: URL: http://www.rep-co.nl/Documents/Pub1%20Executive%20Summaries/REPCO-Period%203%20Publishable%20Executive%20Summary.pdf [retrieved on 2009-03-19] page 5, line 11 - page 6, line 10	1,3-15
X	WO 2007/139382 A2 (PRAKTIJKONDERZOEK PLANT & OMGE [NL]; BENGTSSON MARIANNE VIBEKE [DK]; H) 6 December 2007 (2007-12-06) cited in the application the whole document example 1	7-15
X	SCOTT P M ET AL: "Cladosporin, a new antifungal metabolite from Cladosporium cladosporioides." THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS NOV 1971, vol. 24, no. 11, November 1971 (1971-11), pages 747-755, XP008103678 ISSN: 0021-8820 cited in the application the whole document	7-15
X	JACYNO JOHN M ET AL: "Isocladosporin, a biologically active isomer of cladosporin from Cladosporium cladosporioides" JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS (LLOYDIA), vol. 56, no. 8, 1993, pages 1397-1401, XP008103627 ISSN: 0163-3864 the whole document	7-15
X	FISS M ET AL: "Isolation and characterization of epiphytic fungi from the phyllosphere of apple as potential biocontrol agents against apple scab (Venturia inaequalis)" ZEITSCHRIFT FUER PFLANZENKRANKHEITEN UND PFLANZENSCHUTZ, vol. 107, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 1-11, XP001536930 ISSN: 0340-8159 abstract	7-15
	----- -/--	

171

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2008/050794

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LUONGO L ET AL: "Potential of fungal antagonists for biocontrol of Fusarium spp. in wheat and maize through competition in crop debris" BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY, vol. 15, no. 3, May 2005 (2005-05), pages 229-242, XP008091576 ISSN: 0958-3157 abstract	7-15
X	TATAGIBA JOSELI DA SILVA ET AL: "Biological control of Botrytis cinerea in residues and flowers of rose (Rosa hybrida)" PHYTOPARASITICA, vol. 26, no. 1, 1998, pages 8-19, XP001055177 ISSN: 0334-2123 abstract	7-15
A	EDEN M A ET AL: "Biological control of Botrytis stem infection of greenhouse tomatoes" PLANT PATHOLOGY (OXFORD), vol. 45, no. 2, 1996, pages 276-284, XP008091578 ISSN: 0032-0862 cited in the application abstract	7-15
A	PEREIRA O L ET AL: "The mycobiota of the weed Mitracarpus hirtus in Minas Gerais (Brazil), with particular reference to fungal pathogens for biological control" AUSTRALASIAN PLANT PATHOLOGY, vol. 34, no. 1, 2005, pages 41-50, XP008091630 ISSN: 0815-3191 abstract	1,2
A	BR FIO 406 274 A (FUNDAÇÃO AMPARO A PESQUISA DO ESTADO) 19 September 2006 (2006-09-19) claims 1-9	1,2

172

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2008/050794

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 2007139382	A2	06-12-2007	AR	060980 A1	23-07-2008
BR PI0406274	A	19-09-2006	NONE		

PATENT COOPERATION TREATY

FC-T/NL2008/050794

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

HATZMANN, M.J.
Vereenigde
Johan de Wittlaan 7
NL-2517 JR Den Haag
PAYS-BAS

Date of mailing (day/month/year) 16 December 2009 (16.12.2009)
Applicant's or agent's file reference P83408PC00
International application No. PCT/NL2008/050794

IMPORTANT NOTIFICATION
International filing date (day/month/year) 12 December 2008 (12.12.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:				
☒ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent	☐ the common representative	
Name and Address PLANT RESEARCH INTERNATIONAL B.V. Droevendaalsesteeg 1 NL-6708 PB Wageningen Netherlands		State of Nationality NL	State of Residence NL	
		Telephone No.		
		Facsimile No.		
		E-mail address		
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:				
☐ the person	☒ the name	☒ the address	☐ the nationality	☐ the residence
Name and Address STICHTING DIENST LANDEBOUWKUNDIG ONDERZOEK Costerweg 50 NL-6701 BH Wageningen Netherlands		State of Nationality NL	State of Residence NL	
		Telephone No.		
		Facsimile No.		
		E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized		
3. Further observations, if necessary:				
4. A copy of this notification has been sent to:				
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority			
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned			
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned			
	☐ other:			

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Snell Matthew e-mail pt11.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 11
Facsimile No. +41 22 338 70 80	

7. Composición para controlar un fitopatógeno de hojas, frutos y espigas en la que un extracto de *Cladocporium* está presente según reivindicaciones 1 y 2.
8. Un método para controlar un patógeno en plantas, que comprende tratar dichas plantas con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-6.
9. Un método según reivindicación 8, en la que dicha composición es rociada en las hojas, frutos o espigas de la planta.
10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en la que el control del patógeno comprende prevención de la infección o disminución del daño de la planta causado por dicho patógeno.
11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en la que dicho patógeno es seleccionado del grupo que conforman la sarna del manzano (*Venturia inaequalis*), la roña o moteado de la pera (*Venturia pirina*), manchas de la hoja (*Blumeriella jaapi*), mancha negra del rosál (*Diplocarpon rosae*/Marsosonina *rosae*), la mancha marrón del peral (*Sternophyllum vesicarium*), oidios de varias plantas tales como la fresa, las rosas y las manzanas (*Podosphaera leucotricha*/*Sphaerotheca pannosa*), oidio de la begonia (*Microsphaera begoniae*), oidio de la fresa (*Sphaerotheca macularis*), enfermedad del hollín (*Gloeodes pomigena*), mancha de mosca (*Zygophiala jamaicensis*), lepra del melocotonero o abolladura (*Taphrina deformans*), pudrición marrón, cancro (*Monilia fructigena*), roya del peral (*Gymnosporangium sabinae*), chancro (*Nectria galligena*), mancha negra del rosál (*Diplocarpon rosae*), roya del rosál (*Phragmidium tuberculatum*/ *Phragmidium* spp.) Botrytis spp. En varias plantas, *Mycosphaerella brassicicola* in la col, *Mycosphaerella fijiensis* en el banano, *Alternaria* spp. in Brassica, papa and varias other plants, *Fusarium* spp. especially in cereals including maize, *Phytophthora infestans* of potato and *Plasmopara viticola* in vid, preferably wherein said fungal foliar pathogen is apple scab.

175

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 8001

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 57,092
FECHA : JULIO 12 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-086001- -00000-0000

Fecha: 2010-07-14 16:40:35 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE/II Eve. 278 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 177

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	770814	12/07/2010	39,730,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I *** TASA ANUAL AÑOS 9 a 12 CUATRENIO	437,000.00

TOTAL : \$ 437,000.00

SON: CUATROCIENTOS TREINTA Y SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Qdo 17127-841-001-0

(76)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 46,558
FECHA : JUNIO 8 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-086001- -00000-0000

Fecha: 2010-07-14 16:40:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 177

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VAL. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175542430	08/06/2010	39,560.000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	45 CAUCIONES
			234,000.00
TOTAL :			\$ 234,000.00

SON: DOSCIENTOS TREINTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Ch 17727-841-001-0

(77)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 55,134
FECHA : JULIO 6 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-086001- -00000-0000

Fecha: 2010-07-14 16:40:35 Dep. 2020 DIR.MUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 177

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	156799985	06/07/2010	32,255,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	21 CERTIFICACIONES
		TOTAL :	\$ 13,000.00

SON: TRECE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

No 17127-846001-0



No. 10-086001- -00000-0000

Fecha: 2010-07-14 16:40:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Evt: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 177

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DI

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Descripción de la invención
☐ Dibujos de ser estos pertinentes
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒ Dibujos de ser estos pertinentes
☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
STICHTING DIENST LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK

REFERENCIA	Radicación No.	10 086001
	Solicitud internacional	pct/nl2008/050794
	Fecha inicio fase nacional	14/07/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

009500

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)
3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal f) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 086001


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

30 JUL 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11