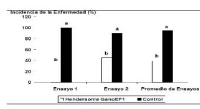


DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT



1	Título de la Invención (200 caracteres o espacios máximos)		
COMPOSICIONES PARA CONTROLAR LA ENFERMEDAD GANODERMA EN PLANTAS Y METODO PARA USO DEL HONGO ENDOFITICO, HENDERSONIA GanoEF1			
2	Datos del Solicitante / Titular		
Nombre:		MALAYSIAN PALM OIL BOARD	Dirección Electrónica:
			sic@castellanosyco.co
Dirección:		No. 6, Persiaran Institusi, Bandar Baru Bangi, 43000 Kajang, Selangor, MALASIA	Domicilio/País de constitución:
			MALASIA - SELANGOR - SELANGOR
Identificación:			
☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT	

Número: 516861772875-																	
3	Solicitantes																
<table><tr><td>Apellidos - Nombres o Razón Social</td><td>Tipo</td><td colspan="2">Identificación</td></tr><tr><td>1. MALAYSIAN PALM OIL BOARD</td><td>NN</td><td colspan="2">516861772875</td></tr></table>				Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación		1. MALAYSIAN PALM OIL BOARD	NN	516861772875							
Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación															
1. MALAYSIAN PALM OIL BOARD	NN	516861772875															
4	Datos del Inventor																
Nombre:		IDRIS ABU SEMAN	Dirección Electrónica: sic@castellanosyco.co														
Dirección:		9, Jalan Kajang Raya 6, Taman Kajang Raya, Sungai Chua, 43000 Kajang, Selangor Darul Ehsan, MALASIA	Domicilio/País de constitución: MALASIA - SELANGOR - SELANGOR														
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT ☒ No Aplica Número: -																	
5	Inventor(es)																
<table><tr><td>Apellidos - Nombres</td><td>Domicilio</td></tr><tr><td>1. SEMAN IDRIS ABU</td><td>MALASIA</td></tr><tr><td>2. KUSHAIRI DIN AHMAD</td><td>MALASIA</td></tr><tr><td>3. MOSLIM RAMLE</td><td>MALASIA</td></tr><tr><td>4. RAMLI NUR RASHYEDA</td><td>MALASIA</td></tr><tr><td>5. AHMAD ZAIRUN MADIHAH</td><td>MALASIA</td></tr><tr><td>6. SEBRAN NOOR HAIDA</td><td>MALASIA</td></tr></table>				Apellidos - Nombres	Domicilio	1. SEMAN IDRIS ABU	MALASIA	2. KUSHAIRI DIN AHMAD	MALASIA	3. MOSLIM RAMLE	MALASIA	4. RAMLI NUR RASHYEDA	MALASIA	5. AHMAD ZAIRUN MADIHAH	MALASIA	6. SEBRAN NOOR HAIDA	MALASIA
Apellidos - Nombres	Domicilio																
1. SEMAN IDRIS ABU	MALASIA																
2. KUSHAIRI DIN AHMAD	MALASIA																
3. MOSLIM RAMLE	MALASIA																
4. RAMLI NUR RASHYEDA	MALASIA																
5. AHMAD ZAIRUN MADIHAH	MALASIA																
6. SEBRAN NOOR HAIDA	MALASIA																

6	Datos Inventor(es)			
	País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	MALASIA	SELANGOR	SELANGOR	9, Jalan Kajang Raya 6, Taman Kajang Raya, Sungai Chua, 43000 Kajang, Selangor Darul Ehsan, MALASIA
2.	MALASIA	SELANGOR	BANDAR BARU SALAK TINGGI	No. 5, Jalan 4/5E Seksyen 4, 43650, Bandar Baru Bangi, Selangor Darul Ehsan, MALASIA
3.	MALASIA	SELANGOR	KAJANG, SELANGOR	10, Jalan Dahlia 1, Desa Dahlia, Sungai Ramal, 43000 Kajang, Selangor Darul Ehsan, MALASIA
4.	MALASIA	JOHOR	PEKAN NENAS	286-1. Jalan Parit Haji Baki 84000 Muar, Johor Darul Takzim, MALASIA
5.	MALASIA	PERAK	BATU GAJAH	PT. 4984, Kg Tersusun Sentang, Laluan Sentang 6, 31000, Batu Gajah, Perak DARul Ridzuan, MALASIA
6.	MALASIA	NEGERI SEMBILAN	NILAI	PT. 7036, Jalan Casuarina 2, Desa Casuarina, Putra Nilai, 71800, Nilai Negeri Sembilan, MALASIA
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			

Nombre:	MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:	CALLE 94A 7A 09	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 39779654-			
Presentación de Poder			
Año de Radicación			
Número de Radicación			
8	Datos Solicitud: PCT / WO		
Número Solicitud:	PCT/MY2012/000291	Fecha Solicitud:	29/11/2012
Número Publicacion:	WO 2013/081448 A2	Fecha Publicacion:	06/06/2013
9	Declaraciones de prioridad	☒ SI ☐ NO	
1.	(33) País de origen MALASIA	Codigo del país MY	(31) No. Solicitud PI 2011005782
			(32) Fecha 29/11/2011
10	Reivindicaciones		
Número reivindicaciones:		13	Pago Reivindicaciones: Si
11	Reducción de tasas.		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente. ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro			

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12 Documentos Anexos

- ☒ Reivindicaciones
- ☒ Descripción
- ☐ Dibujos y/o Figuras
- ☐ Resumen
- ☐ Certificado Depósito Material Biológico
- ☐ Uso de Conocimiento tradicional
- ☐ Listado de secuencias
- ☒ Artes finales 12 x 12 cm
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☒ Otros Anexos

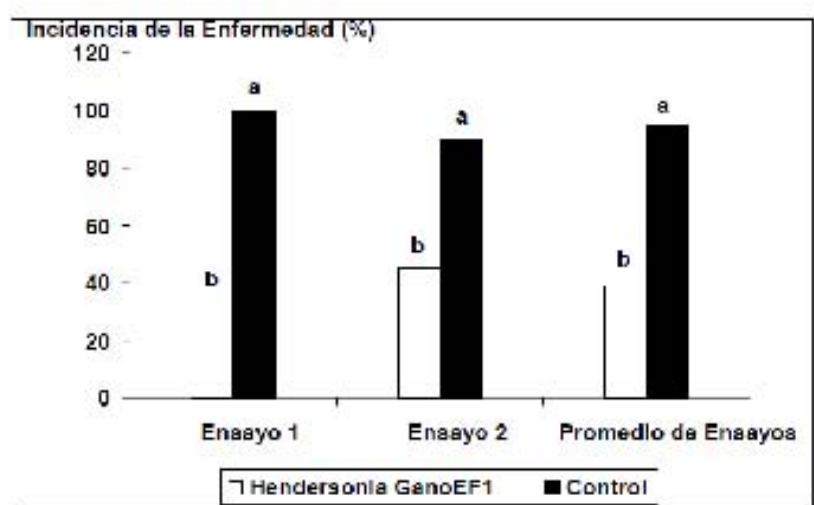


FIG 1

**COMPOSICIONES PARA CONTROLAR LA ENFERMEDAD GANODERMA EN
PLANTAS Y MÉTODO PARA USO DEL HONGO ENDOFÍTICO, HENDERSONIA**

GanoEF1

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a métodos para controlar enfermedades de plantas y más particularmente a la identificación y aislamiento de una especie de hongo con actividad biológica contra las enfermedades de *Ganoderma*, y composiciones que
10 comprenden dichos especies de hongos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] En general se acuerda que los aspectos científicos juegan un papel importante
15 para contribuir a la mejora de diversas características de los cultivos y los cultivos en los que se investiga se han convertido en vitales para los expertos de la industria agrícola, y se ha escrito mucho sobre ellos.

[0003] En la mayoría de los casos, la ciencia de la manipulación de las plantas se centra
20 en la mejora de la calidad o en productos de alto valor, la diversificación de productos, y en particular para ayudar a mejorar o lograr un mayor rendimiento total de cultivos o plantas, además de la obtención de los caracteres y atributos vegetales deseados. Otro aspecto imprescindible en vista del desarrollo económico agrícola es el manejo de la enfermedad.

25

[0004] En los últimos años, una de las diversas enfermedades de las plantas ampliamente conocida por ser una gran amenaza en particular para el cultivo de palma de aceite es la Podredumbre del Tallo Basal (BSR). Ha habido un consenso general dentro de la industria de la palma de aceite que BSR es la principal vía de infección. Los resultados han
30 demostrado que la BSR es causada generalmente por una especie de *Ganoderma*, un hongo de la descomposición de la madera. El *Ganoderma* produce enzimas que degradan el tejido de palma de aceite y afecta gradualmente al xilema de la palma de aceite infectada lo que produce graves problemas en la distribución de agua y otros nutrientes a la parte superior de la palmera (Paterson et al, 2008, Current Enzyme inhibition). En
35 consecuencia, la palma pierde su capacidad de producir frutos y, finalmente, se derrumbará. Se ha informado que Las infecciones están aumentando rápidamente en

numerosas fincas en muchos países y algunos informes han mostrado que las palmas más jóvenes de alrededor de 5 años de edad también pueden verse afectadas.

5 [0005] Como un esfuerzo preliminar en el desarrollo de una solución para resolver este problema creciente, los estudios llevados a cabo han permitido a los investigadores identificar con éxito cuatro especies de *Ganoderma* asociados con la enfermedad de BSR de la palma de aceite; estos son *G. boninense*., *G. zonatum*, *G. miniatocinctum* y *G. tornatum*. Entre los cuatro, *G. boninense* ha sido identificado como el de más virulencia y más aniquilador en Malasia y varios países del Sur-este asiático.

10

[0006] Los agentes a base microbiana han demostrado efectos significativos contra enfermedades de las plantas; con lo cual hay varios microbios prominentes identificados y caracterizados que han demostrado propiedades antagonistas contra *G. boninense*, tales como *Trichoderma*, *Aspergillus*, y *Penicillium*.

15

[0007] Los endófitos, más a menudo las bacterias o los hongos viven dentro de los espacios intracelulares de plantas durante al menos la totalidad de sus ciclos de vida sin causar enfermedades perjudiciales para sus plantas huésped. Estos hongos viven de nutrientes apoplásticos que se producen naturalmente en las plantas. Algunos hongos pueden ser aislados de familias de plantas huésped, mientras que otros se limitan a acoger especies dentro de una familia de plantas en particular. Los resultados recientes (Marciano et al, 2005) han demostrado que un tipo de hongo endofítico, *Gliocladium catenulatum* exhibió propiedades antagonistas contra la enfermedad Escoba de Bruja causada por *Broom Crinipelis perniciososa* en plántulas de cacao. Aunque se ha descrito el uso de endófitos para tal enfermedad específica, aún hay gran necesidad de identificar y caracterizar más hongos a base de plantas con el propósito de manejar la enfermedad asociada a diversas plantas.

20

25

[0008] Debido a que el aceite de palma es uno de los cultivos comerciales más importantes de Malasia, ha sido identificado como el candidato más probable para el desarrollo de una producción y renovación de plantas a gran escala (Ravigadevi et al, Genetic engineering in oil palm. In Advances in Oil Palm Research. (eds). Yusof, Jalani, and Chan Malaysia Palm Oil Board. 1:284-331, 2000) para los productos químicos derivados del aceite de palma. Como se señaló anteriormente, la propagación desenfrenada de la infección por enfermedades en el cultivo de palma de aceite hará que poco a poco un impacto significativo en el crecimiento económico de la industria.

30

35

[0009] Después de lo anterior, hay una necesidad de identificar un método para resolver los problemas evidentes con respecto a las enfermedades de palma de aceite, y, en particular la enfermedad de podredumbre del tallo basal (BSR) de la enfermedad.

5 RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] En un aspecto, la invención proporciona un método para controlar las enfermedades asociadas a *Ganoderma*, dicho método incluye proporcionar una composición que comprende gránulos nutrientes suplementados con un hongo viable
10 propágulos de un hongo endofítico.

[0011] En otro aspecto, la invención proporciona un cultivo aislado de un hongo identificado como *Hendersonia* GanoEF1 utilizado para la preparación de la composición.

15 [0012] Otro aspecto de la invención proporciona un método para tratar o controlar la infección de la enfermedad de *Ganoderma* en la palma de aceite.

[0013] En otro aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento o control de la enfermedad Podredumbre del Tallo Basal (BSR) utilizando una composición que
20 comprende propágulos fúngicos viables de un hongo endofítico, dicho hongo del género *Hendersonia*.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

25 [0014] La Figura 1 muestra el porcentaje de incidencia de la enfermedad (DI%) de plántulas debido a la infección *G. boninense* a los seis meses de tratamiento con la composición de la presente invención;

[0015] La Figura 2 representa el porcentaje de severidad de los síntomas foliares (% de
30 SFS) de plántulas debido a la infección *G. boninense* a los seis meses de tratamiento con la composición de la presente invención; y

[0016] La figura 3 representa el porcentaje de plántulas muertas (% DS) debido a la
35 infección de *G. boninense* a los seis meses de tratamiento con la composición de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 [0017] Además de la comprensión del objetivo, la construcción, las características y las funciones de la invención, a continuación se da una descripción detallada con referencia a las formas de implementación.

10 [0018] Las implementaciones de la presente invención se basan en parte en la identificación y el aislamiento de un hongo endofítico que es útil en un método para controlar enfermedades de *Ganoderma* en la planta de palma de aceite.

15 [0019] La composición de acuerdo con una forma de implementación preferida de la presente invención se puede preparar sobre la base de un cultivo puro de un hongo endofítico denominado como *Hendersonia* GanoEF1. La composición puede estar en forma de, pero no limitando a gránulos, o un bio-fertilizante.

[0020] De acuerdo con la implementación preferida de la presente invención, se describe un método para producir las formas formuladas del hongo como se identifica anteriormente.

20 [0021] La presente descripción de la presente invención proporciona un hongo endofítico que ha identificado por presentar efectos sustanciales en el control de la infección de BSR en la palma de aceite. Se observó que la composición que comprende dicho hongo mostró una reducción significativa de la incidencia de la enfermedad (%) en las plántulas germinadas de palma de aceite.

25 [0022] La presente descripción proporciona además el aislamiento de un hongo identificado como *Hendersonia* GanoEF1, por lo que dicho hongo tiene efectos inusuales contra BSR, y que tiene características inoculantes únicas en el control de la enfermedad *Ganoderma* de la palma de aceite.

30 [0023] Se observa que el perfil del hongo *Hendersonia* GanoEF1 ha sido identificado por tener una alta similitud con *Neoscytalidium dimidiatum* (DQ 377924.1). Aunque el género *Neoscytalidium* ha sido reconocido como uno de los hongos patógenos de las plantas, no han habido sin embargo aislamientos previos de un género similar o informes que están
35 asociados a esta categoría de hongos como una cura para las enfermedades de la palma de aceite, o que se usen en el control de enfermedades de la palma de aceite. Aunque se

conoce que *Hendersonia* está asociada con el género Coelomycetes, hasta ahora todavía no se ha reportado como parte de una cura o composición para controlar o inhibir las infecciones de enfermedades de la palma de aceite.

5 **[0024] Caracterización de *Hendersonia* GanoEF1**

Se realizó un análisis de la secuencia estándar para identificar el perfil de ADN del hongo utilizado de acuerdo con la presente invención. Como se discutió brevemente antes, se observa que el perfil del hongo tiene una alta similitud con el de *Neoscytalidium dimidiatum* (DQ377924.1-NCBI). En este análisis, se seleccionaron veinte primers
10 (cebadores) (OP1 a OP20) con el fin de identificar los marcadores de ADN para la identificación del hongo. Tres marcadores han demostrado bandas intactas de imagen en gel de agarosa por lo tanto indica el perfil del hongo aislado de acuerdo con la presente invención.

15 De acuerdo con la presente invención, utilizando el software LALIGN (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) se ha encontrado que el sujeto *Hendersonia* GanoEF1 es 44% similar a la *Pleospora* sp. Cepa LM-2009a del Espaciador Transcrito Interno 1, secuencia parcial, gen RNA 5.8S ribosomal, Espaciador transcrito Interno 2, secuencia parcial anamorfa *Hendersonia* osteospermi (FJ481946.1). La
20 búsqueda de similitud se hizo mediante el uso de la matriz de puntuación BLOSUM 62 y el alineamiento local (archivo de la matriz: /usr/molbio/share/fasta3/blosum62.mat(11/-4), gap-open/ext:-14/-4 E (limit) 0,05). Aproximadamente 577 nucleótidos se superpusieron (1-541:435-1006), el resultado es 1008 E (10000): -1

25 La secuencia obtenida es la siguiente:

GCATCCTAGCCGAAGCGAGATCCTCAGTCCAGGCTGGCCGCATTCCACCCCGGGCT
ATAACACTCCCCGAGAGGAGCTACGTTCCCGGGGCCTTTATCCGACCGCCCGAACTG
ATGCTGGCCTGGCCGCAGAAGAGTGCGCCGGTCAGGAGACCGGCTGAGCAACTGC
GGACAAGTCTGGCTGCAAGCGCTTCCCTTTCAACAATTTACGTACTTTTTAACTCTCT
30 TTCAAAGTGCTTTTCATCTTTCGATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCTGGCCG
GTATTTAGCTTTAGAAAGAAATTTACCTCCATTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGA
CTCGTCGAAGGAGATTCACATGGCTAAGGCAGCCCACCGCATACGGGATTCTCACCC
TCTATGACGCCCCGTTCCAGGGGACTTAGGCGGGAGCCCTCGCCGAATCATCCTCTA
CAAATTACAACGCGGACCCCCGGGGGGGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTGTTGCCGCT
35 TCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTCCGCCGCTTATTGA

EJEMPLOS

[0025] El método de preparación y uso de la presente invención además se ilustra mediante los siguientes ejemplos experimentales. Se debe entender que estos ejemplos experimentales, aunque indican implementaciones preferidas de la invención, están dados solamente a manera de la mejor elucidación. Una persona versada en el arte puede determinar las características esenciales y formas de implementación de esta invención, por lo tanto, se pueden proporcionar varios cambios para adaptar a diversos usos y condiciones.

10

[0026] EJEMPLO 1: Preparación de gránulos nutrientes Suplementados a base de Hendersonia GanoEF1

[0027] Las esporas de hongos se propagaron en matraces cónicos de 1 litro (L) que contenían 250 mililitros (mL) de medios líquidos. En este experimento, los medios preferidos comprenden efluentes de molino de la planta de la palma de aceite (PME) y 9% en peso por volumen (p/v) de azúcar morena. Los matraces se trataron en autoclave a una temperatura de 120°C durante 20 minutos y se inocularon mediante la adición de suspensión de esporas que contenía aproximadamente 10^8 esporas por ml (esporas/ml), por lo que dichas esporas se prepararon sobre la base de cultivos viejos de 12 días. Los matraces se colocaron a continuación en un agitador orbital y corrieron a 150 revoluciones por minuto (rpm) durante cuatro días a la temperatura de 30°C. Los propágulos viables resultantes se utilizaron para preparar los gránulos que se describirán a continuación en el presente documento.

25

[0028] EJEMPLO 2: Preparación de la forma Formulada de Gránulos-Hongo

[0029] La forma formulada del hongo se puede preparar con un método que se describirá en el presente documento, por el cual es evidente para una persona versada en el arte que la secuencia de las etapas involucradas puede variar para alcanzar el resultado deseado, sin embargo, no exceden el alcance de las reivindicaciones como se proporcionan.

30

[0030] La primera etapa fue la preparación de una solución de alginato que contiene aproximadamente 1% (p/v) de ácido algínico por disolución de alginato de sodio en alcohol absoluto. A continuación, la solución de alginato se mezcla con agua destilada

35

hasta que se disuelva. Los propágulos cultivados en el matraz de 250 ml se homogenizaron hasta romper los micelios en pequeños fragmentos. Los micelios y esporas del homogenizado se mezclaron con la solución de alginato preparado anteriormente hasta completar un volumen total de solución de 2L. A continuación, alrededor del 20% (p/v) de caolín y 10% (p/v) de lentejas se añadieron lentamente en el homogenizado obtenido anteriormente. Cabe señalar que el caolín y las lentejas se trataron en autoclave antes de ser añadidos con el fin de evitar la contaminación. El proceso de granulación de la presente invención implicó el uso de una bomba peristáltica conectada con puntas de micropipeta. La mezcla se redujo en gotitas por medio de la micropipeta, con lo cual dichas gotas se introducen en un recipiente que contiene el agente coagulante y se formaron los gránulos de forma redonda durante esta etapa. Dentro de 2 a 4 minutos, los gránulos se enjuagaron con agua destilada esterilizada y posteriormente se secaron en flujo laminar durante 24 horas.

[0031] Las lentejas se añadieron para suministrar sustratos nutrientes, fuentes de carbono y nitrógeno al hongo para esporulación de larga duradera a los gránulos especialmente cuando se aplica sobre las plantas. Por otra parte el caolín se añade para proporcionar densidad a los gránulos de la presente invención y por lo tanto actúa como un material absorbedor para absorber la humedad de los sustratos húmedos. La humedad es un factor de crecimiento para micelios y para la producción de esporas.

[0032] El coagulante preferido utilizado para la preparación de la composición formulada de acuerdo con la implementación preferida de la presente invención es cloruro de calcio (CaCl_2), para el que la concentración es de aproximadamente 0,5% (p/v).

[0033] Los gránulos secados preparados de acuerdo con el método de la presente invención se pueden almacenar en condiciones secas a temperatura ambiente.

[0034] De acuerdo con la implementación preferida de la presente invención, los gránulos se aplican preferiblemente directamente sobre las raíces de la palma de aceite para promover la colonización en raíces de la palma de aceite. Durante la aplicación, para la cual el método preferido es el de permitir el contacto con las plántulas y los hoyos de plantación, los gránulos absorberán suficiente humedad para iniciar el proceso de crecimiento. Los gránulos iniciarán la producción de esporas después de 4 a 5 días después del crecimiento del hongo.

[0035] La composición como se describió anteriormente se ensayó en plántulas de palma de aceite, para lo cual dichas plántulas se trataron con los gránulos de la presente invención y se inocularon con *G. boninense*. La composición se aplicó periódicamente con base en la edad de crecimiento de la palma de aceite.

5

[0036] EJEMPLO 3: Análisis de los efectos de la composición sobre plántulas germinadas de palma de aceite

[0037] 15 gramos de la formación de gránulos de *Hendersonia* GanoEF1 como se
 10 prepararon en la sección anterior, se aplicaron en la raíz de las plántulas germinadas durante la transferencia a la pequeña bolsa de polietileno de tamaño de 6 x 9 cm para promover la colonización en las raíces de la palma de aceite. A los cuatro meses de edad, las plántulas se transfirieron a la bolsa de polietileno de gran tamaño 15 x 18 cm y se aplicaron 50 gramos de gránulos de *Hendersonia* GanoEF1. Las plántulas tratadas y no
 15 tratadas se inocularon con el bloque *G. boninense* utilizando la técnica de sentado Rubber Wood Block (RWB). En los meses siguientes, se aplicaron 30 gramos de gránulos *Hendersonia* GanoEF1 a las plántulas tratados. Todas las plantas se mantuvieron en el vivero, se suplementaron con fertilizante normal y se regaron diariamente. Las plántulas no tratadas con la composición de la presente invención se inocularon con *G. boninense*
 20 y se prepararon como muestras de control.

[0038] Seis meses después del tratamiento, las plántulas tratadas con la composición que comprende *Hendersonia* GanoEF1 muestran un menor porcentaje de incidencia de la enfermedad (% DI) según trazado en la figura 1. El desarrollo de la enfermedad también
 25 se controló en función del porcentaje de severidad de los síntomas foliares (% SFS).

[0039] Además se observó que hubo diferencias significativas entre las plántulas tratadas con la composición de la presente invención y las plántulas no tratados, a los 6 meses, como se muestra en Fig. 2. En el caso del porcentaje de plántulas muertas, las plántulas
 30 no tratadas mostraron el mayor porcentaje de plántulas muertas y la cantidad de plántulas muertas en las plántulas tratadas se redujo significativamente. Esto se muestra en la figura 3, evidentemente.

[0040] Como se ve en la figura 1, las muestras tratadas con la composición que comprende *Hendersonia* GanoEF1 de la presente invención exhiben al menos 60% de reducción de la incidencia de la enfermedad en comparación con las muestras sin tratar.
 35

Se observa que las plántulas tratadas con gránulos *Hendersonia* GanoEF1 mostraron un porcentaje significativamente más bajo ($p<0,05$) de incidencia de la enfermedad (DI) en un promedio de 39,2% comparadas con el 95% de las plántulas no tratadas. En la figura 2, el porcentaje de severidad de los síntomas foliares (SFS) de las muestras tratadas se redujo en al menos el 50% en porcentaje en comparación con las muestras sin tratar. En consecuencia, los SFS porcentaje promedio de las plántulas tratadas con gránulos *Hendersonia* GanoEF1 (54.5%) fue significativamente menor ($p<0,05$) que la de las plántulas no tratadas. Se observa que el porcentaje promedio SFS de plántulas tratados con gránulos *Hendersonia* GanoEF1 (54.5%) fue significativamente más bajo ($p <0,05$) en comparación con las plántulas no tratados (90,5%). Se observó que se reduce considerablemente el porcentaje de plántulas muertas debido a la infección *G. boninense* para las muestras tratadas, con lo que se registró la reducción de al menos el 70%. Para esto, se observa que el porcentaje promedio de plántulas muertas en el control mostró el más alto porcentaje de plántulas muertas en 80,8% y significativamente ($p<0,05$) cuando se compara con las plántulas tratadas con gránulos *Hendersonia* GanoEF1 al 34,2%.

[0041] Además, las muestras tratadas con la composición preparada de acuerdo con la presente invención dieron el área más baja bajo la Curva del Progreso de la enfermedad (AUDPC) de 86.6 y 89.0 en dos ensayos comparados con las plántulas no tratadas con AUDPC de 193,3 y 190,0 para ambos ensayos, respectivamente. La TABLA 1 más adelante proporciona un resumen de la comparación AUDPC entre las muestras tratadas y las muestras sin tratar discutidos anteriormente:

[0042] Tabla 1: Efecto de los gránulos *Hendersonia* GanoEF1 sobre el desarrollo de la enfermedad Podredumbre del Tallo Basal (BSR) en las plántulas de aceite de palma a los seis meses después del tratamiento

Tratamientos	Ensayo 1		Ensayo 2	
	AUDPC [#]	DR ^{##} (%)	AUDPC [#]	DR ^{##} (%)
Plántulas no tratadas con gránulos de <i>Hendersonia</i> GanoEF1 e inoculados con <i>G. boninense</i> (control)	193.34	-	190.0	-

Plántulas tratadas con gránulos <i>Hendersonia</i> GanoEF1 inoculados con <i>G. boninense</i> (control)	86.67	55.17	89.0	53.15
---	-------	-------	------	-------

Nota: # Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (AUDPC). ## Reducción de la Enfermedad (DR).

Reducción Promedio de la enfermedad (DR) = 54.16%

5

[0043] Se concluye que la composición que comprende *Hendersonia* GanoEF1 controla exitosamente la infección de *Ganoderma* en muestras de las plántulas tratadas con dicha composición, como es evidente en los gráficos de la figura 1 a la figura 3. Comprensiblemente, la composición de la presente invención se puede utilizar para inhibir o prevenir la infección de *Ganoderma* en palma de aceite.

10

[0044] La composición de la presente invención puede ser efectiva para el tratamiento de las palmas de aceite infectadas con *Ganoderma* puesto que la composición ayuda a controlar la infección de *Ganoderma* en las palmas de aceite. Cabe señalar que las especies de *Ganoderma* puede ser una cualquiera de entre el grupo de *G. boninense*, *G. zonatum*, *G. miniatocintum* y *G. tornatum*.

15

[0045] Aunque la presente invención ha sido descrita con referencia a las implementaciones preferidas y ejemplos de la misma, es evidente para aquellos versados en el arte que se pueden hacer una variedad de modificaciones y cambios sin que se aparten del alcance de la presente invención, la cual se define por las reivindicaciones adjuntas.

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición para el tratamiento de plantas infectadas con *Ganoderma* que comprende un hongo endofítico, en la que dicho hongo endofítico es del género
5 *Hendersonia*.
2. Una composición como se reivindica en la reivindicación 1 en la que la composición se utiliza para controlar la infección de *Ganoderma* en plantas.
- 10 3. Una composición como se reivindica en la reivindicación 1 en la que la composición es para el tratamiento y el control de la infección de *Ganoderma* en la palma de aceite.
4. Una composición como se reivindica en la reivindicación 1 en la que la
15 composición se usa para el tratamiento de la de la enfermedad podredumbre del tallo basal (BSR) en las palmas de aceite.
5. Una composición para el control de la infección en las palmas de aceite infectadas por *Ganoderma*; dicha composición comprende una formulación de propágulos
20 viables de un hongo endofítico del género *Hendersonia*.
6. Una composición como se reivindica en la reivindicación 5 en la que la composición se usa para el tratamiento de la enfermedad podredumbre del tallo basal (BSR) en las palmas de aceite.
25
7. Una composición como se reivindica en la reivindicación 5 en la que la composición está en la forma de gránulos.
8. Una composición como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 6, para uso como
30 un agente de control de enfermedades de las plantas.
9. Un proceso para producir la composición como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 8, que comprende los pasos de:
Preparar la solución de alginato;
35 mezclar dicha solución de alginato con agua destilada;

homogenizar micelios y esporas del hongo para de este modo romperlos en pequeños fragmentos;

adicionar una cantidad predeterminada de caolín y lentejas;

reducir la mezcla en gránulos; y

5 enjuagar dichos gránulos y someter dichos gránulos a un proceso de secado.

10. Un método para controlar una enfermedad de las plantas, que comprende la etapa de tratar una planta objetivo con una composición que comprende una formulación de propágulos viables de un hongo endofítico del género *Hendersonia*.

10

11. Un método como el reivindicado en la reivindicación 9 en el que la etapa de tratar una planta objetivo comprende la aplicación de gránulos que comprenden propágulos viables de un hongo endofítico del género *Hendersonia* a cualquier parte de dicha planta.

15 12. Un método como se reivindica en la reivindicación 10, en el que la enfermedad de la planta es la Podredumbre del Tallo Basal (BSR), y dicha planta es la palma de aceite.

20 13. Un método para inhibir y prevenir la infección de *Ganoderma* en las palmas de aceite, dicho método comprende la aplicación de una composición como las reivindicadas en las reivindicaciones 1 a 8.



(51) International Patent Classification:

A61K 35/74 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)

A61K 35/66 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)

A61K 36/07 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/MY2012/000291

(22) International Filing Date:

29 November 2012 (29.11.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

PI 2011005782 29 November 2011 (29.11.2011) MY

(71) Applicant: MALAYSIAN PALM OIL BOARD

[MY/MY]; No. 6, Persiaran Institusi, Bandar Baru Bangi, 43000 Kajang, Selangor (MY).

(72) Inventors: SEMAN, Idris, Abu; 9, Jalan Kajang Raya 6, Taman Kajang Raya, Sungai Chua, 43000 Kajang, Selangor Darul Ehsan (MY). KUSHAIRI DIN, Ahmad; No. 5, Jalan 4/5E Seksyen 4, 43650, Bandar Baru Bangi, Selangor Darul Ehsan (MY). MOSLIM, Ramle; 10, Jalan Dahlia 1, Desa Dahlia, Sungai Ramal, 43000 Kajang, Selangor Darul Ehsan (MY). RAMLI, Nur, Rashyeda; 286-1, Jalan Parit Haji Baki 84000 Muar, Johor Darul Takzim (MY). AHMAD ZAIRUN, Madihah; PT. 4984, Kg Tersusun Sentang, Laluan Sentang 6, 31000, Batu Gajah, Perak Darul Ridzuan (MY). SEBRAN, Noor, Haida; PT. 7036, Jalan Casuarina 2, Desa Casuarina, Putra Nilai, 71800, Nilai Negeri Sembilan (MY).

(74) Agent: MOHAN, K.; Adastra Intellectual Property Sdn Bhd, A-28-10, Menara UOA Bangsar, No. 5, Jalan Bangsar Utama 1, 59000 Kuala Lumpur (MY).

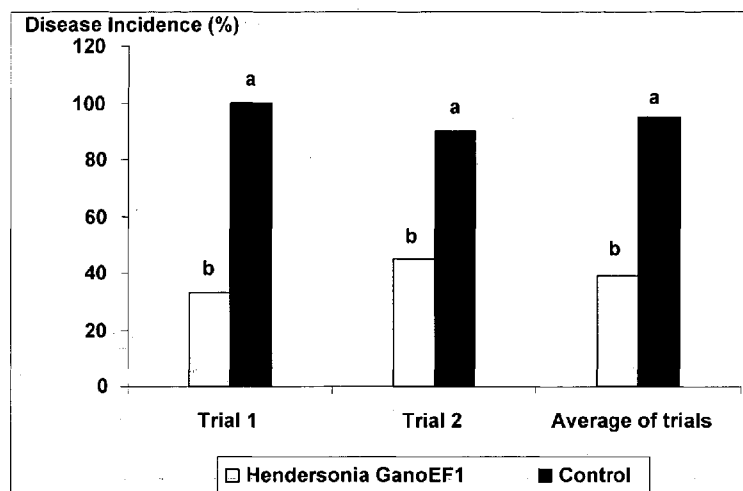
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

(54) Title: COMPOSITIONS FOR CONTROLLING GANODERMA DISEASE IN PLANTS AND METHOD THEREOF BY USING ENDOPHYTIC FUNGUS, HENDERSONIA GANOEF1



(57) Abstract: There is provided a composition comprising an endophytic fungus from the Hendersonia genus, for treatment of Ganoderma-infected plants and more particularly oil palm. The treatment includes controlling the development of Ganoderma infection in oil palm.

**COMPOSITIONS FOR CONTROLLING GANODERMA DISEASE IN PLANTS AND
METHOD THEREOF BY USING ENDOPHYTIC FUNGUS, HENDERSONIA**

GanoEF1

5 FIELD OF INVENTION

[0001] The present invention relates to methods for controlling plant diseases and more particularly to the identification and isolation of a fungal species with biological activity against *Ganoderma* diseases, and compositions comprising said fungal species.

BACKGROUND OF INVENTION

15 [0002] It is generally agreed that scientific aspects play a major role in contributing to improvements of various crop traits and cultivation to which such researches have become vital for the experts of the agricultural industry, and much has been written about them.

20

[0003] In most cases, the science of manipulation in plants is focused on improvements of quality or high-value products, diversification, and in particular for assisting in improving or achieving increased total yield of crops or plants, in addition to obtaining desired vegetative

25

characters and attributes. Another imperative aspect in view of agricultural economic development is disease management.

[0004] In recent years, one of the various plant diseases widely known to be a major threat particularly for oil palm cultivation is the Basal Stem Rot (BSR). There has been a general consensus within the oil palm industry that BSR is the primary route of infection. Findings have shown that BSR is generally caused by a species of *Ganoderma*, a wood decaying fungus. *Ganoderma* produces enzymes that degrades the oil palm tissue and gradually affects the infected oil palm xylem thus resulting to severe problems to the distribution of water and other nutrients to the top of palm tree (Paterson et al, 2008, Current Enzyme Inhibition). Consequently, the palm will lose its ability to produce fruits and will eventually collapse. Infections have been reported to be rapidly increasing in numerous estates in many countries and some reports have shown that younger palms of around 5 years old can also be affected.

20

[0005] As a preliminary effort in developing a solution to resolve this growing concern, extensive studies have enabled researchers to successfully identify four species of *Ganoderma* associated with BSR disease of oil palm; these are *G. boninense*, *G. zonatum*, *G. miniatocinctum* and *G. tornatum*. Among all four, *G. boninense* has been identified as the most

25

virulence and most annihilating in Malaysia and several South East Asian countries.

[0006] Microbial based agents have shown significant effects against plant diseases; whereby there are several prominent microbials identified and characterised to have shown antagonistic properties against *G. boninense*, such as *Trichoderma*, *Aspergillus*, and *Penicillium*.

[0007] Endophytes, more often bacteria or fungi live within the intracellular spaces of plants for at least all of their life cycles without causing any harmful diseases to their host plants. These fungi live off apoplastic nutrients which are naturally occurring in plants. Some fungi can be isolated from host plant families while others are restricted to host species within a particular plant family. Recent findings (Marciano et al, 2005) have shown that a type of endophytic fungus, *Gliocladium catenulatum* exhibited antagonistic properties against Witches Broom disease caused by *Crinipelis perniociosa* in cacao seedlings. Although the use of endophytes has been disclosed for such specific disease, there is still dire need to identify and thus characterise more plant based fungus for the purpose of disease management associated to various plants.

[0008] Because oil palm is one of the most important

commercial crops in Malaysia, it has been identified as the most likely candidate for the development of a large scale production and renewal plant (Ravigadevi et al, *Genetic engineering in oil palm. In Advances in Oil Palm Research.*

5 (eds). Yusof, Jalani, and Chan *Malaysia Palm Oil Board*. 1:284-331, 2000) for palm oil-derived chemicals. As discussed earlier, unrestrained spread of diseases infection in oil palm cultivation will gradually cause a significant impact on the economic growth of the industry.

10

[0009] Following the above, there is a need to identify a method to address the glaring issues with respect to oil palm diseases, and in particular Basal Stem Rot (BSR) disease.

15

SUMMARY OF THE INVENTION

[0010] In one aspect, the invention provides a method for controlling *Ganoderma* associated diseases, said method includes providing a composition comprising nutrient supplemented granules of viable fungal propagules of an endophytic fungus.

[0011] In another aspect, the invention provides an isolated culture of a fungus identified as *Hendersonia* GanoEF1 used for the preparation of the composition.

[0012] Another aspect of the invention provides a method for treating or controlling *Ganoderma* disease infection in oil palm.

5

[0013] In another aspect, the invention provides a method for treating or controlling Basal Stem Rot (BSR) disease using a composition comprising viable fungal propagules of an endophytic fungus, said fungus from the *Hendersonia* genus.

10

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0014] Figure 1 depicts the percentage of disease incidence (DI%) of seedlings due to *G. boninense* infection at six months of treatment with the composition of the present invention;

15

[0015] Figure 2 depicts the percentage of severity of foliar symptoms (%SFS) of seedlings due to *G. boninense* infection at six months of treatment with the composition of the present invention; and

20

[0016] Figure 3 depicts the percentage of dead seedlings (%DS) due to the infection of *G. boninense* infection at six

25

months of treatment with the composition of the present invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5

[0017] Further understanding of the object, construction, characteristics and functions of the invention, a detailed description with reference to the embodiments is given in the following.

10

[0018] Embodiments of the present invention are predicated in part on the identification and isolation of an endophytic fungus which is useful in a method for controlling *Ganoderma* diseases in oil palm plant.

15

[0019] The composition according to a preferred embodiment of the present invention may be prepared based on a pure culture of an endophytic fungus named as *Hendersonia* GanoEF1. The composition may be in the form of, but not limiting to granules, or a bio-fertilizer.

20

[0020] In accordance to the preferred embodiment of the present invention, there is disclosed a method for producing the formulated forms of the fungus as identified above.

25

[0021] The present disclosure of the present invention provides an endophytic fungus that has been identified to exhibit substantial effects in controlling the BSR infection in oil palm. It is observed that the composition comprising said fungus showed significant reduction of Disease Incidence (%) in germinated seedlings of oil palm.

[0022] The present disclosure further provides the isolation of a fungus identified as *Hendersonia* GanoEF1, whereby said fungus has unusual effects against BSR, and having unique inoculants feature in controlling *Ganoderma* disease of oil palm.

[0023] It is observed that the profile of *Hendersonia* GanoEF1 fungus has been identified to have high similarity with *Neoscytalidium dimidiatum* (DQ 377924.1). Although the *Neoscytalidium* genus has been reported to be recognized as one of the plant pathogen fungi, however there has yet to be any prior isolates of a similar genus or reports that are associated to this category of fungi as a cure to oil palm diseases, or used in controlling oil palm diseases. While *Hendersonia* is known to be associated with the *Coelomycetes* genus, and so far has yet to be reported as part of a cure or composition for controlling or inhibiting infections of diseases in oil palm.

[0024] Characterization of *Hendersonia GanoEF1*

A standard sequence analysis was performed to identify the DNA profile of the fungus used in accordance with the present invention. As briefly discussed above, it is observed that the profile of the fungus has high similarity to that of *Neoscytalidium dimidiatum* (DQ377924.1 - NCBI). In this analysis, twenty primers (OP1 to OP20) were screened in order to identify the DNA markers for the identification of the fungus. Three markers have shown intact bands in agarose gel image thus indicates the profile of the fungus isolated in accordance with the present invention.

In accordance with the present invention, using LALIGN software ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html))

the subject *Hendersonia GanoEF1* has been found 44% similar to *Pleospora* sp. strain LM-2009a Internal Transcribed Spacer 1, Partial sequence, 5.8S Ribosomal RNA gene, Internal Transcribed Spacer 2, Partial sequence anamorph *Hendersonia osteospermi* (FJ481946.1). The similarity search was done by using BLOSUM 62 matrix scoring and local alignment (matrix file: /usr/molbio/share/fasta3/blosum62.mat (11/-4), gap-open/ext: -14/-4 E(limit) 0.05). About 577 nucleotides were overlapping (1-541:435-1006), score is 1008 E (10000):-

The sequence obtained is as follows:

GCATCCTAGCCGAAGCGAGATCCCTCAGTCCAGGCTGGCCGCAATCCACCCCGGGGTATAA
CACTCCCCGAGAGGAGCTACGTTCCGGGGGGCCTTTATCCGACCGCCCGAACTGATGCTGG
5 CCTGGCCCGCAGAAGAGTGGCCCGGTCAGGAGACCGGCTGAGCAACTCCGGACAAGTCTGC
CTGCAAGCCGCTTCCCTTTCAACAATTTACGCTAGTTTTTAACTCTCTTTCCAAAGTCTTT
TTGATCTTTGATCAGTCTACTTGTGGGCTATCCGTTCTCTGGCCGGTATTTAGCTTTAGA
AGAAATTTACCTCCCATTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCGTCCAAGGAGATT
CACATGGCTAAGGCAGCCGACCCGATACGGGATTCTCACCTCTATGAGGCCCGGTTCCA
10 GGGGACTTAGGGGGGAGCCCTCGCCGAATCATCCTCTACAAATTACAACGGCGACCCCGG
GGGGGGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTGTTGGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCC
CTGTTGGTTCCTTTTCCGCCGCTTATTGA

EXAMPLES

15

[0025] The method of preparation and use of the present invention is further illustrated by the following experimental examples. It should be understood that these experimental examples, while indicating preferred
20 embodiments of the invention, are given by way better elucidation only. A person skilled in the art can ascertain the essential characteristics and embodiments of this invention, therefore various changes may be provided to adapt to various usages and conditions.

25

[0026] EXAMPLE 1: Preparation of Nutrient Supplemented Granules based on *Hendersonia Gano*EF1

[0027] Fungal spores were propagated in 1 liter (L) conical flasks which contained 250 mililiter (mL) of liquid media. In this experiment, the preferred media comprised of palm oil mill effluent (POME) and 9% by weight per volume (w/v) of jaggery. The flasks were autoclaved at a temperature of 120°C for 20 minutes and inoculated by adding spore suspension which contained about 10^8 spores per mL (spores/mL), whereby said spores were prepared based on 12 days old cultures. The flasks were then placed on an orbital shaker and ran at 150 revolutions per minute (rpm) for four days at the temperature of 30°C. The resultant viable propagules were used to prepare the granules which will be described herein below.

[0028] EXAMPLE 2: Preparation of Formulated form of Fungus -Granules

20

[0029] The formulated form of the fungus may be prepared with a method which will be described herein, whereby it is apparent to a person skilled in the art that the sequence of the steps involved may vary to achieve the intended result however not exceeding the scope of claims as provided.

25

[0030] The first step was preparing alginate solution which contains about 1% (w/v) alginic acid by dissolving sodium alginate into absolute alcohol. Then the alginate solution was mixed with distilled water until dissolved.

5 Propagules grown in 250mL flask were homogenized so as to break up the mycelia into small fragments. The homogenate mycelia and spores were mixed with the alginate solution prepared earlier thus accumulated to a total of 2L solution. Next, about 20% (w/v) of kaolin and 10% (w/v) of dhal were
10 added slowly into the homogenate obtained earlier. It should be noted that kaolin and dhal were autoclaved prior to being added so as to prevent contamination. Granulation process of the present invention involved the use of a peristaltic pump attached with micropipette tips. The mixture was reduced
15 into droplets by means of the micropipette, whereby said droplets were introduced into a container containing coagulant agent and round shaped granules were formed during this stage. Within 2 to 4 minutes, the granules were rinsed with sterilized distilled water and later on dried in
20 laminar flow for 24 hours.

[0031] Dhal was added to supply nutrient substrates, carbon and nitrogen sources to the fungus for long lasting sporulation to the granules especially when it is applied on
25 plants. Kaolin on the other hand was added to as to provide density to the granules of the present invention and thus

acts as an absorber material to absorb moisture from moist substrates. Moisture is a growth factor for mycelia and for producing spores.

5 **[0032]** The preferred coagulant used for the preparation of formulated composition in accordance with the preferred embodiment of the present invention is Calcium Chloride (CaCl_2), whereby the concentration is about 0.5% (w/v).

10 **[0033]** The dried granules prepared in accordance with the method of the present invention can be stored under dry conditions at room temperature.

~~**[0034]**~~ According to the preferred embodiment of the
15 present invention, the granules are preferably applied directly on roots of the oil palm to promote colonization into oil palm roots. During application, whereby the preferred method is to allow contact with seedlings and planting holes, granules will absorb sufficient moisture to
20 initiate the growing process. The granules will start producing the spores after 4 to 5 days after the fungal growth.

[0035] The composition as described above was tested on
25 seedlings of oil palm, whereby said seedlings were treated with the granules of the present invention and inoculated

with *G. boninense*. The composition was applied periodically based on the growth age of the oil palm.

[0036] EXAMPLE 3: Analysis on the Effects of the

5. Composition on Germinated Seedlings of Oil Palm

[0037] 15 grams *Hendersonia* GanoEF1 granules formation as prepared in the previous section was applied into the root of the germinated seedlings while transferring to the small polyethylene bag sized 6 x 9 cm to promote the colonization into the oil palm roots. At four month old, the seedlings were transferred to the big polyethylene bag sized 15 x 18 cm and 50 grams of *Hendersonia* GanoEF1 granules was applied. The treated and untreated seedlings were then inoculated with *G. boninense* block using Rubber Wood Block (RWB) sitting technique. At subsequent months, 30 grams of *Hendersonia* GanoEF1 granules was applied to the treated seedlings. All the seedlings were maintained in the nursery, supplemented with normal fertilizer and watered daily. Seedlings untreated with the composition of the present invention and inoculated with *G. boninense* were prepared as Control Samples.

[0038] Six months after treatment, seedlings treated with the composition comprising *Hendersonia* GanoEF1 shows a lower percentage of Disease Incidence (%DI) as plotted in FIG 1.

Disease development was also monitored based on the percentage of Severity of Foliar Symptoms (%SFS).

[0039] It is further observed that there were significant differences between seedlings treated with the composition of the present invention and untreated seedlings, at 6 months, as shown in FI 2. In the case of deadline seedlings percentage, untreated seedlings showed the highest percentage of dead seedlings and the amount of dead seedling in treated seedlings was significantly reduced. This is evidently shown in FIG 3.

[0040] As seen in FIG 1, samples treated with the composition comprising *Hendersonia GanoEF1* of the present invention exhibited at least 60% of disease incidence reduction as compared to untreated samples. It is observed that seedling treated with *Hendersonia GanoEF1* granules showed a significant ($p < 0.05$) lower percentage of disease incidence (DI) at average 39.2% compared to untreated seedlings at 95%. In FIG 2, the percentage of severity of foliar symptoms (SFS) of treated samples was reduced by at least 50% in percentage when compared to untreated samples. Accordingly, the average percentage SFS of seedlings treated with *Hendersonia GanoEF1* granules (54.5%) was significantly lower ($p < 0.05$) than that of the untreated seedlings. It is observed that the average percentage SFS of seedlings

treated with *Hendersonia* GanoEF1 granules (54.5%) was significantly ($p < 0.05$) lower compared to the untreated seedlings (90.5%). The percentage of dead seedlings due to *G. boninense* infection was observed to be considerably reduced for treated samples, whereby at least 70% reduction was recorded. For this, it is observed that the average percentage of dead seedlings in control showed the highest percentage of dead seedlings at 80.8% and significantly ($p < 0.05$) as compared to the seedlings treated with *Hendersonia* GanoEF1 granules at 34.2%.

[0041] Further, the samples treated with the composition prepared in accordance with the present invention gave lowest Area Under Disease Progress Curve (AUDPC) of 86.6 and 89.0 in two trials compared to untreated seedlings with AUDPC of 193.3 and 190.0 for both trials respectively. TABLE 1 below provides a summary on the AUDPC comparison between the treated samples and untreated samples as previously discussed:

[0042] TABLE 1: Effect of *Hendersonia* GanoEF1 Granules on Basal Stem Rot (BSR) Disease Development in Oil Palm Seedlings at Six Months After Treatment

Treatments	Trial 1		Trial 2	
	AUDPC [#]	DR ^{##} (%)	AUDPC [#]	DR ^{##} (%)
Seedlings untreated with <i>Hendersonia</i> GanoEF1 granules and inoculated with <i>G. boninense</i> (control)	193.34	-	190.0	-
Seedlings treated with <i>Hendersonia</i> GanoEF1 granule and inoculated with <i>G.</i> <i>boninense</i> (T1)	86.67	55.17	89.0	53.15

Note: [#] Area Under Disease Progress Curve (AUDPC). ^{##} Disease Reduction (DR).

Average disease reduction (DR) = **54.16%**

- 5 [0043] It is concluded that the composition comprising *Hendersonia* GanoEF1 successfully controlled the *Ganoderma* infection on samples of seedlings treated with said composition, as evident in the graphs of FIG 1 to FIG 3. Understandably, the composition of the present invention may

be used to inhibit or prevent further infection of *Ganoderma* in oil palm.

[0044] The composition of the present invention may be effective for the treatment of *Ganoderma* infected oil palms, whereby the composition aids to control the infection of *Ganoderma* in oil palms. It should be noted that the *Ganoderma* species may be any one from the group of *G.boninense*, *G. zonatum*, *G. miniatocintum* and *G. tornatum*.

[0045] Although the present invention has been described with reference to the preferred embodiments and examples thereof, it is apparent to those skilled in the art that a variety of modifications and changes may be made without departing from the scope of the present invention which is intended to be defined by the appended claims.

CLAIMS

1. A composition for the treatment of *Ganoderma*-infected plants comprising an endophytic fungus, wherein said
5 endophytic fungus is from the *Hendersonia* genus.

2. A composition as claimed in Claim 1 wherein the composition is used to control the infection of *Ganoderma* in plants.

10

3. A composition as claimed in Claim 1 wherein the composition is for the treatment and controlling the infection of *Ganoderma* in oil palm.

15 4. A composition as claimed in Claim 1 wherein the composition is used for treatment of Basal Stem Rot (BSR) disease in oil palms.

5. A composition for controlling infection in *Ganoderma*-
20 infected oil palms; said composition comprising a formulation of viable propagules of an endophytic fungus from the *Hendersonia* genus.

6. A composition as claimed in Claim 5 wherein the
25 composition is used for treatment of Basal Stem Rot (BSR) disease in oil palms.

7. A composition as claimed in Claim 5 wherein the composition is in the form of granules.

8. A composition as claimed in Claims 1 to 6, for use as a
5 plant disease control agent.

9. A process for producing the composition as claimed in Claims 1 to 8, comprising the steps of:

preparing alginate solution;

10 mixing said alginate solution with distilled water;

homogenizing mycelia and spores of the fungus thus breaking it into small fragments;

adding a predetermined amount of kaolin and dhal;

~~reducing the mixture into granules; and~~

15 rinsing said granules and subjecting said granules to a drying process.

10. A method for controlling a plant disease, comprising the step of treating a target plant with a composition
20 comprising a formulation of viable propagules of an endophytic fungus from the *Hendersonia* genus.

11. A method as claimed in Claim 9 wherein the step of treating a target plant comprises applying granules
25 comprising viable propagules of an endophytic fungus from the *Hendersonia* genus to any part of said plant.

12. A method as claimed in Claim 10, wherein the plant disease is Basal Stem Rot (BSR), and said plant is oil palm.

13. A method of inhibiting and preventing the infection of
5 *Ganoderma* in oil palms, said method comprising applying a composition as claimed in Claims 1 to 8.

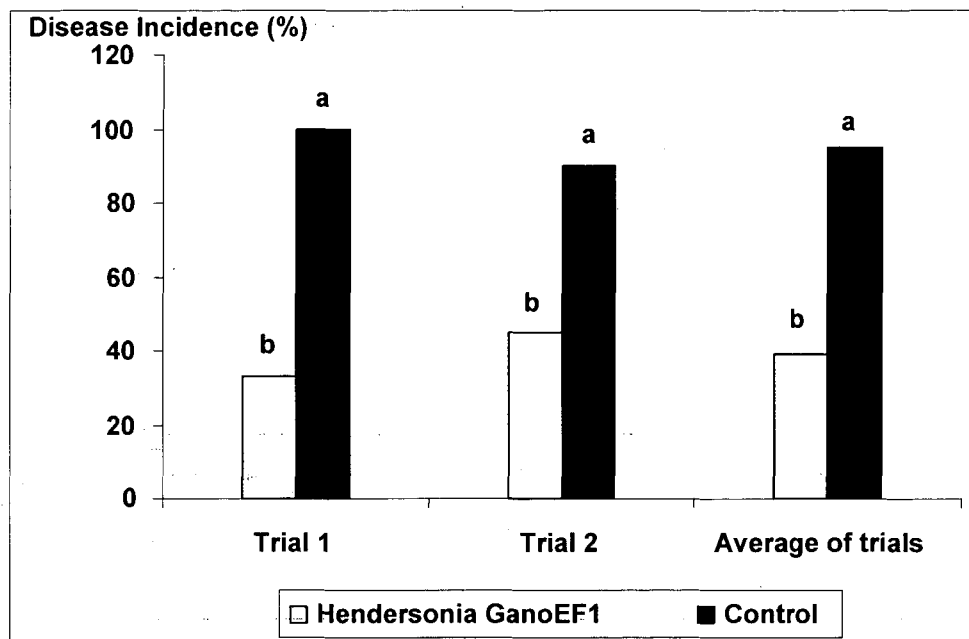


FIG 1

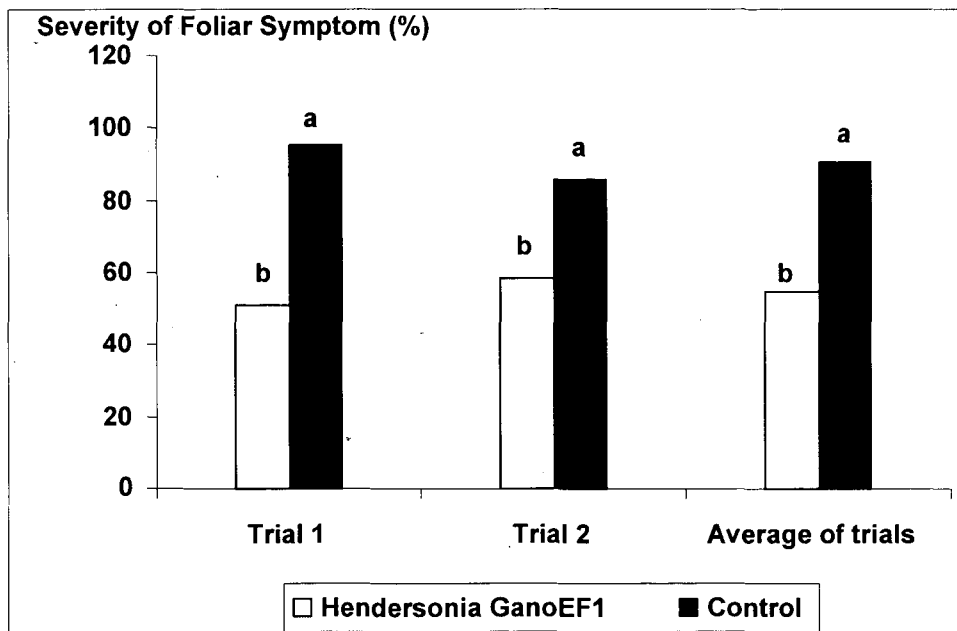


FIG 2

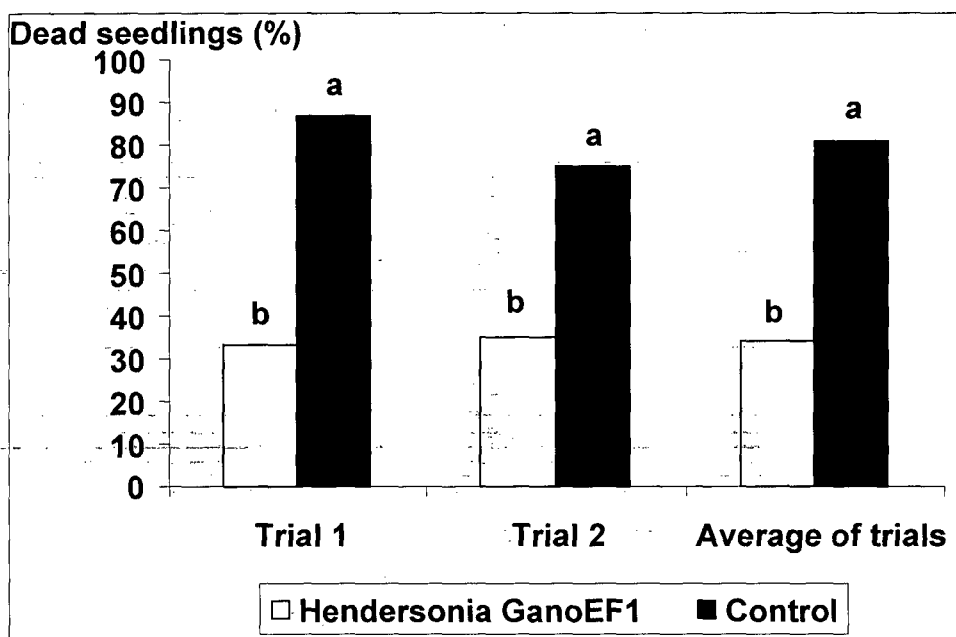


FIG 3

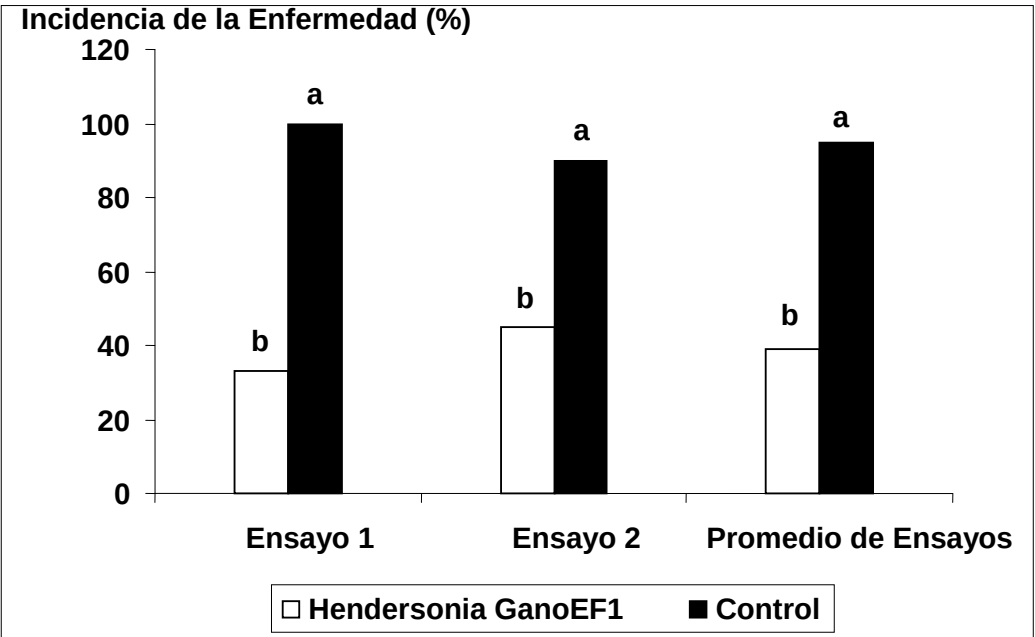


FIG 1

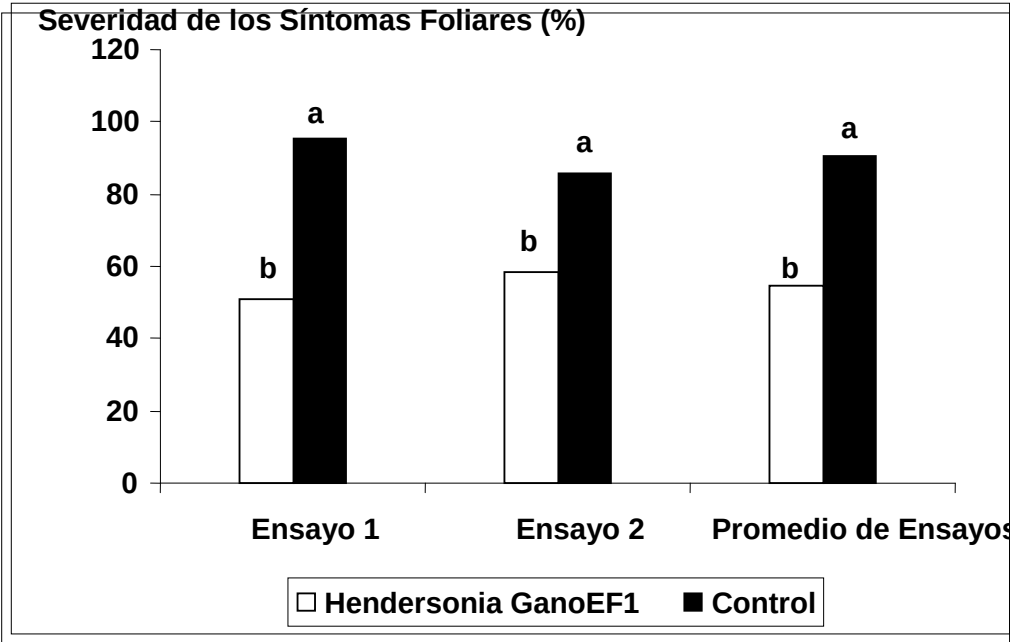


FIG 2

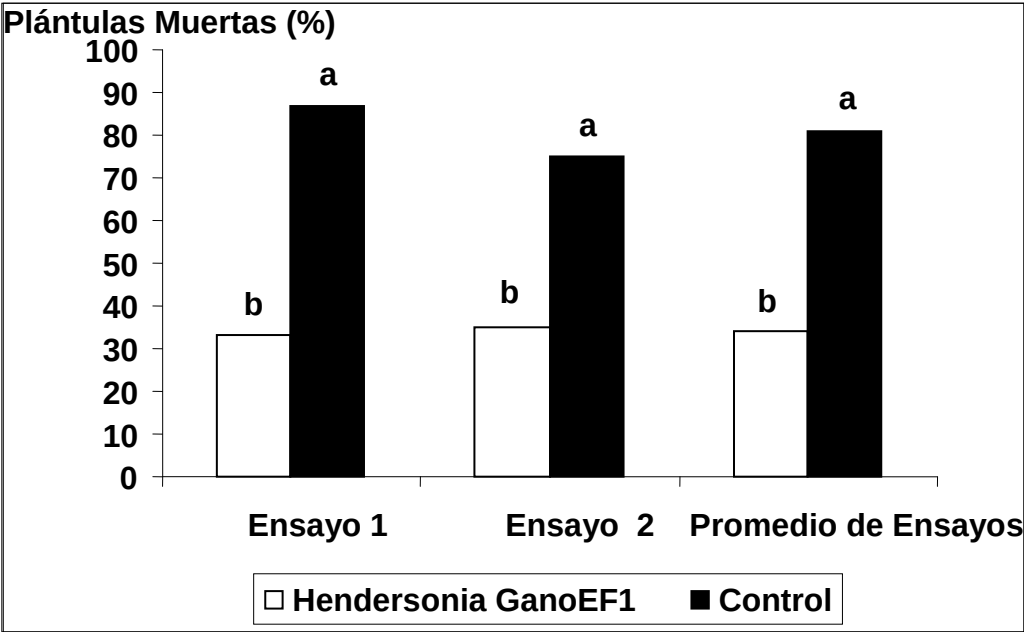


FIG 3

COLOMBIA

PODER

El (los)

Domiciliados en

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial e intelectual y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso -administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio; cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- b) Para la obtención de protección de variedades vegetales
- c) Para la obtención de registros sanitarios;
- d) Para la obtención de registros de derechos de autor.
- e) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato entre los apoderados, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extra-judiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy

en

por

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned, **MALAYSIAN PALM OIL BOARD**

Of No. 6, Persiaran Institusi, Bandar Baru Bangi, 43000 Kajang, Selangor, MALAYSIA hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, to

and to obtain the protection of my (our) Intellectual Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- b) For the obtainment of plant variety protection
- c) For the obtainment of Sanitary registrations;
- d) For the obtainment of copyright registrations
- e) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this

in **Kuala Lumpur, MALAYSIA**

by



BURHANUDDIN ABO SALAM

CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

CALLE 94 A No. 7 A - 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
castellanos@castellanosyco.co