

COMPOSICIONES DE TRICHODERMA Y MÉTODOS DE USO

REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

5 La presente solicitud reclama la prioridad conforme al número 35 U.S.C. §119(e) sobre la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. de Serie: 62/052.209, presentada el 18 de Septiembre de 2014, y se incorpora al presente como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La invención se refiere a la formación de propágulos microescleróticos (microesclerocios) por hongos micoparasíticos y al uso de esos microesclerocios para el control de enfermedades en las plantas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El género *Trichoderma* es un conocido hongo cosmopolita del suelo que ha sido ampliamente explorado como antagonista de numerosos hongos patógenos de las plantas (Howell CR, 2003. Mecanismos empleados por las especies de *Trichoderma* en el control biológico de las enfermedades de las plantas: Historia y evolución de los conceptos actuales *Plant Disease* 87: 4–10, Harman GE, 2006. Visión general de los mecanismos y
20 usos de *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190–194). Los aislamientos de las especies de *Trichoderma* pueden ser exitosos en el control de enfermedades de las plantas debido a que antagonizan directamente la actividad patógena y/o inducen respuestas de resistencia del huésped (Harman GE, 2000. Mitos y dogmas del biocontrol: Cambios en las percepciones derivadas de la investigación sobre *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant*
25 *Disease* 84: 377–393). Además, la función de *Trichoderma* como promotor del crecimiento de las plantas ha sido reportada para algunas cepas después del establecimiento como un simbionte vegetal no estricto por la colonización de la rizósfera (Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M, 2004. Especies de *Trichoderma* - simbiontes vegetales oportunistas y avirulentos. *Nature Reviews Microbiology* 2: 43–56; Harman GE, Kubicek
30 PK, 1998. *Trichoderma and Gliocladium* Vol 2. Enzimas, control biológico y aplicaciones comerciales. Taylor y Francis, Londres 1–393). Se describieron diferentes modos de acción

para las cepas de *Trichoderma* empleadas como agentes de control biológico: a) competencia de la rizósfera al colonizar el suelo y/o partes de la planta o mediante la competencia por los nutrientes; b) mico parasitismo mediante la producción de una amplia variedad de enzimas degradantes de las paredes celulares contra patógenos; c) antibiosis
5 mediante la producción de compuestos antimicrobianos (volátiles y no volátiles) que pueden matar a los patógenos; d) la promoción del crecimiento mediante el mejoramiento del desarrollo de las plantas y la inducción de respuestas defensivas sistémicas en las plantas (Harman y Kubicek, 1998, *ibíd.*; Harman, 2006, *ibíd.*).

10 Actualmente, la mayoría de los productos de *Trichoderma* en el mercado de biopesticidas se basan en conidios aéreos sólidos producidos por sustrato. Los conidios aéreos de *Trichoderma* se producen mediante fermentación de sustrato sólido sobre granos humedecidos y este proceso lleva semanas para la producción y el secado, lo que aumenta los costos de producción. (Pandey A, Fernandes M, Larroche C, 2008. *Current*
15 *developments in solid-state fermentation* Springer New York. EE.UU., 517p. DOI: 10.1007/978-0-387-75213-6; Ramanujam B, Prasad RD, Rangeswaran R, 2010. Producción en masa, formulación, control de calidad y administración de *Trichoderma* para el manejo de enfermedades de las plantas. *The Journal of Plant Protection Sciences* 2(2): 1–8). La producción de conidios fúngicos en granos humedecidos sufre numerosas
20 limitaciones, incluyendo altos costos de mano de obra, control de calidad deficiente, tiempos prolongados de fermentación, preocupaciones ambientales para los trabajadores y dificultades en el aumento a escala. Se han investigado métodos de producción de cultivos líquidos enfocados en la producción de conidios sumergidos y clamidosporas de *Trichoderma* (Lewis JA, Papavizas GC, 1983. Producción de clamidosporas y conidios por
25 *Trichoderma* spp. en medios de crecimiento líquidos y sólidos. *Soil Biology and Biochemistry* 15: 351–357; Papavizas GC, Dunn MT, Lewis JA, Beagle-Ristaino J, 1984. Tecnología de fermentación líquida para la producción experimental de hongos de biocontrol. *Phytopathology* 74(10): 1171–1175; Tabachnik M, 1989. Método de cultivo de *Trichoderma*. Patente de EE.UU. 4,837,155A; Harman GE, Jin X, Stasz TE, Peruzzotti G,
30 Leopold AC, Taylor AG, 1991. Producción de biomasa de conidios de *Trichoderma harzianum* para el control biológico. *Biological Control*: 23-28; Jin X, Taylor AG, Harman GE, 1996. Desarrollo de medios y métodos automatizados de fermentación líquida para

producir propágulos tolerantes a la desecación de *Trichoderma harzianum*. *Biological Control* 7: 267–274; Sriram S, Roopa KP, Savitha MJ, 2011. Larga vida útil de la fermentación líquida derivada de las formulaciones de cuento de *Trichoderma harzianum* con la adición de glicerol en el medio de producción. *Crop Protection* 30: 1334–13339). Los estudios de formulación se centraron en los procesos de estabilización de la biomasa de *Trichoderma*, conidios aéreos y clamidosporas que proporcionaron una estabilidad de almacenamiento adecuada (Lewis JA, Papavizas GC, 1985. Características de los sedimentos de alginato formulados con *Trichoderma* y *Gliocladium* y su efecto sobre la proliferación de los hongos en el suelo. Microcapsulación de conidios aéreos de *Trichoderma harzianum* mediante secado por aspersión a temperaturas elevadas. *Biological Control* 56: 202–208 Yonsel YS, Batur MS, 2010. Producción de gránulos de *Trichoderma*. Patente EP20080866322, Sriram y colaboradores, 2011, *ibíd.*). A pesar de estos intentos de producir *Trichoderma* en cultivo líquido, los bajos rendimientos, los largos tiempos de fermentación y la mala tolerancia a la desecación y la estabilidad al almacenamiento han dificultado la adopción a gran escala de esta metodología de producción por la industria.

Para satisfacer las expectativas del mercado de biopesticidas y promover el uso de *Trichoderma* como un fungicida o para promover la salud de las plantas, se debe desarrollar una tecnología de producción de líquido de cultivo eficiente y factible para concebir un producto de alta calidad basado en *Trichoderma*. Preferentemente, el *Trichoderma* sería persistente en el suelo y en material vegetal en descomposición. Con ese fin, muchos hongos patógenos producen esclerocios; es decir, agregados de hifas compactos y melanizados que son altamente resistentes a la desecación. Estos propágulos a menudo sirven como estructura de hibernación para el hongo (Cooke, 1983, *Morphogenesis of sclerotia*, en "*Fungal Differentiation: A Contemporary Synthesis*" Smith, JE, ed. pp 397–418. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, EE.UU.; Coley-Smith and Cooke, 1971, Supervivencia y germinación de esclerocios fúngicos. En "*Annual Review of Phytopathology*", Horsfall, J.G., Baker, K.F., Zentmyer, G.A., eds. pp 65-92, Annual Reviews Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.). Se han producido microesclerocios (pequeñas partículas escleróticas, 200-600 µm) de fitopatógenos fúngicos tales como *Colletotrichum truncatum* y *Mycoleptodiscus terrestris* en alta concentración en fermentación de cultivo

líquido sumergido (Jackson y Schisler, 1995, *Mycological Research*, 99: 879–884, Shearer y Jackson, 2003, Patente Estadounidense N° 6,569,807). Los microesclerocios de estos patógenos de plantas de malezas han demostrado su valor como propágulos persistentes en el suelo y en los ambientes acuáticos (Shearer y Jackson, 2006, *Biological Control*, 5 38:298–306, Boyette y colaboradores, 2007, *BioControl* 52: 413–426). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha reportado ningún microesclerocio para ninguna especie *Trichoderma*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En el presente documento se describen microesclerocios aislados de un hongo, 10 comprendiendo la composición microesclerocios de una especie de *Trichoderma*. En una modalidad de la invención, los microesclerocios aislados son de *Trichoderma harzianum*. En otra modalidad de la invención, los microesclerocios aislados son de *Trichoderma lignorum*. Todavía en otra modalidad de la invención, los microesclerocios aislados son de *Trichoderma viridae*. En una modalidad de la invención, los microesclerocios aislados son 15 de *Trichoderma harzianum*. En otra modalidad de la invención, los microesclerocios aislados son de *Trichoderma reesei*. Todavía en otra modalidad de la invención, los microesclerocios aislados son de *Trichoderma koningii*. En una modalidad de la invención, los microesclerocios aislados son de *Trichoderma pseudokoningii*. Todavía en otra modalidad de la invención, los microesclerocios aislados son de *Trichoderma polysporum*. 20 En otra modalidad de la invención, los microesclerocios aislados son de *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma gamsii*, *Gliocladium virens* y *Gliocladium catenulatum*.

La invención se refiere a una composición que comprende microesclerocios de un 25 hongo, comprendiendo la composición microesclerocios de una especie de *Trichoderma* con un portador agronómicamente aceptable, que dichos microesclerocios, tras la rehidratación, germinan hifalmente o esporogénicamente para producir conidios. En una modalidad de la invención, los microesclerocios están presentes en una cantidad eficaz de control de una enfermedad vegetal. En otra modalidad de la invención, los microesclerocios 30 se encuentran presentes en una cantidad eficaz para promover el crecimiento de la planta. En otra modalidad de la invención, los microesclerocios son producidos por fermentación en cultivo líquido y están presentes en la biomasa recuperada en una concentración de al

menos aproximadamente 1×10^5 microesclerocios por gramo de dicha biomasa.

También se describe en el presente un método para producir un hongo en una alta concentración de microesclerocios fúngicos tolerantes a la desecación. El método
5 comprende la etapa de inocular un medio de cultivo líquido que comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno con propágulos fúngicos de un hongo de biocontrol que comprende hifas o esporas de una especie de *Trichoderma*, teniendo dicha fuente orgánica de nitrógeno una concentración de entre 8 gramos/litro y 40 gramos/litro y dicha fuente de carbono tiene una concentración superior a 40 gramos/litro, incubar los propágulos durante
10 un tiempo suficiente para permitir la producción de microesclerocios; y recoger la biomasa resultante contenedora de microesclerocios. En una modalidad, los microesclerocios resultantes son estables al almacenamiento después de ser secados. En otra modalidad, los microesclerocios resultantes son estables al almacenamiento después de ser aplicados a las semillas. En otra modalidad, los microesclerocios resultantes durante la rehidratación,
15 producen conidios.

También se describe en el presente un método para producir un hongo en una alta concentración de microesclerocios fúngicos tolerantes a la desecación y conidios sumergidos. El método comprende la etapa de inocular un medio de cultivo líquido que
20 comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno con propágulos fúngicos de un hongo que comprende hifas o esporas de una especie de *Trichoderma*, teniendo dicha fuente orgánica de nitrógeno una concentración de entre 8 gramos/litro y 40 gramos/litro y dicha fuente de carbono tiene una concentración superior a 40 gramos/litro, incubando los propágulos en un biorreactor durante un tiempo suficiente para permitir la producción de
25 microesclerocios y conidios sumergidos, aireando el biorreactor a un flujo de aire que mantiene niveles de oxígeno disuelto cerca o por encima de cero y proporcionar al menos $0,1 V_{\text{aire}}/V_{\text{medio de cultivo}}$; y recoger los microesclerocios resultantes y los conidios sumergidos. En una modalidad de la invención, se recogen del método descrito aproximadamente $10,8 \times 10^6$ microesclerocios por litro y aproximadamente $1,9 \times 10^{12}$ conidios sumergidos por litro.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente invención junto con las modalidades descritas puede entenderse mejor a partir de la siguiente descripción detallada de los dibujos, en la que:

5 La **Fig. 1** es un gráfico que representa el impacto de la relación C:N (36 g de carbono L⁻¹) en la producción de conidios por gránulos de microesclerocios secos (MS) de *Trichoderma harzianum* T-22 formulados con tierra de diatomeas al 5% después del secado al aire y durante el almacenamiento a largo plazo bajo condiciones de refrigeración (4 °C). Se evaluó la producción de conidios después de que los gránulos de MS se
10 incubaron en agar de agua durante 7 días a 25 °C. Las medias ($\pm$ SE) en el tiempo "0" se refieren a tolerancia a la desecación y las letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

 Las **Figs. 2A y 2B** son gráficos que muestran la tolerancia a la desecación y la estabilidad al almacenamiento de conidios sumergidos de *Trichoderma harzianum* T-22
15 producidos en diversos medios. Los conidios sumergidos secos se envasaron al vacío y se almacenaron a 4 °C. La germinación de conidios de conidios sumergidos secos se evaluó en agar de agua después de 16 h de incubación a 25 °C. En la **Fig. 2A** se presentan comparaciones múltiples entre las tasas de viabilidad (media $\pm$ SE) antes y después del secado al aire; $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**) o no significativo (ns). En la **Fig. 2B** los círculos
20 completos representan las medias ($\pm$ SE) mientras que las líneas son los datos ajustados por un modelo de decaimiento exponencial: $y = 40 + 40,3\exp(-0,72 \times \text{tiempo})$ ($R^2 = 0,75$) [30:1 C:N, 8 g L⁻¹], $y = 7,7 + 71,6\exp(-0,5 \times \text{tiempo})$ ($R^2 = 0,80$) [50:1 C:N, 8 g L⁻¹], $y = 14,1 + 58,7\exp(-0,39 \times \text{tiempo})$ ($R^2 = 0,79$) [30:1 C:N, 36 g L⁻¹], $y = 17,2 + 61,9\exp(-0,35 \times \text{tiempo})$ ($R^2 = 0,81$) [50:1 C:N, 36 g L⁻¹]. Las curvas de decaimiento de viabilidad fueron comparadas
25 por la prueba de reducción de la suma de cuadrados y letras diferentes indican la diferencia significativa entre las curvas para $P \leq 0,05$.

 La **Fig. 3** es un gráfico que representa la estabilidad de almacenamiento de gránulos microescleróticos (MS) de *Trichoderma harzianum* T-22 producidos en diversos
30 medios líquidos usando harina de semilla de algodón como fuente de nitrógeno. Los cultivos se recolectados después de 4 días de crecimiento a 28 °C y 350 rpm en una incubadora con agitación. Los cultivos que contenían microesclerocios se mezclaron con

tierra de diatomeas, deshidratados y secados al aire hasta menos del 4% de humedad y se almacenaron al vacío a 4 °C o a 25 °C.

La **Fig. 4** es un gráfico que muestra la probabilidad de que las plántulas emergentes sobrevivan al marchitamiento post-emergencia para el melón Cantaloupe (cv. 'Hales Best') sembrado en suelo infestado por *Rhizoctonia solani* aplicado a dos tasas (0,625 y 1,5 g/1000 cm³) con o sin tratamiento biológico con *Trichoderma harzianum* T-22 (0,4 g de gránulos MS/1000 cm³) en bioensayos de cámara de crecimiento. El tiempo censurado para la incidencia de marchitamiento hasta por 15 días después de la siembra. Los valores representan la medias ($\pm$ SE) de tres experimentos independientes. Las curvas de supervivencia seguidas de diferentes letras son estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba log-rank (prueba de rango logarítmico) ($P \leq 0,05$). Las curvas para el control, *T. harzianum* y *T. harzianum* + *R. solani* 0,625 g/1000 cm³ se superponen y no son significativamente diferentes entre sí.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se da a conocer aquí la formación de propágulos microescleróticos por *Trichoderma* y el uso de esos microesclerocios.

Definiciones

Como se usa en la especificación y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "unos" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

Tal como se utiliza en el presente, el término "microesclerocios" se refiere a cuerpos escleróticos pequeños que son un estado de reposo de los hongos. Los microesclerocios son agregados de hifas compactos, estables, viables, a veces melanizados, del hongo. Los microesclerocios en sí no son infecciosos, pero cuando se rehidratan, como por exposición a la humedad en el suelo o dentro de las hendiduras de la corteza de los árboles, los microesclerocios germinarán hifalmente o esporogénicamente para producir conidios que son infecciosos para los patógenos fúngicos de la planta. Los microesclerocios son

extremadamente tolerantes a la desecación, son capaces de germinar tanto de forma esporogénica como vegetativa, y también conservan las capacidades fungicidas de sus formas nativas o normales (es decir, hifas, blastoesporas y/o conidios del mismo hongo). Morfológicamente, los microesclerocios pueden estar presente como un grupo aglomerado de células.

Tal como se utiliza aquí en el término "conidios" se refiere a esporas asexuales, no móviles de un hongo. Los conidios "aéreos" se forman a partir de hifas fúngicas que crecen en un sustrato sólido o pueden formarse directamente de cuerpos escleróticos incluyendo microesclerocios. Los conidios formados en un medio acuoso tal como un caldo de fermentación líquido se denominan conidios "sumergidos".

Tal como se utiliza en el presente, el término "fungicida" se refiere a un material o mezcla de materiales que induce la mortalidad, desorganiza o impide el crecimiento y previene la propagación de hongos blanco. Los fungicidas también se usan para combatir infecciones fúngicas. Los fungicidas pueden ser de contacto o sistémicos. Un fungicida de contacto mata hongos cuando se rocía sobre su superficie. Un fungicida sistémico tiene que ser absorbido por el hongo antes de que el hongo muera. Los procedimientos fungicidas descritos aquí incluyen tratamientos preventivos, protectores, profilácticos y erradicantes.

La invención descrita en el presente es eficaz para producir microesclerocios de cualquier especie, cepa o variedad de hongos micoparasíticos del género *Trichoderma*, aunque también se prevé que la invención pueda usarse para producir microesclerocios de especies del género *Gliocladium*. Las especies preferidas para uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma gamsii*.

La producción de microesclerocios de esta invención se efectúa preferentemente en un cultivo líquido, y la producción a gran escala se realiza preferentemente por

fermentación en líquido de cultivo en tanque profundo. También se prevé que se pueden utilizar medios de cultivo sólidos. El medio líquido utilizado en la preparación del microesclerocios melanizados es crítico, ya que su formación y rendimiento dependen del medio. Para uso en la presente invención, el medio contiene preferentemente una fuente de nitrógeno a una concentración entre 8 gramos de fuente de nitrógeno/litro y menos de 40 gramos de fuente de nitrógeno/litro, y una fuente de carbono a una concentración mayor de 18 gramos de carbohidrato/litro, preferentemente mayor que 40 gramos de carbohidratos/litro. Las fuentes de nitrógeno adecuadas incluyen, pero no se limitan a, caseína hidrolizada, extracto de levadura, proteína de soja hidrolizada, proteína de semilla de algodón hidrolizada, polvo de licor empinado y proteína de gluten de maíz hidrolizada. Las fuentes de carbono adecuadas incluyen, pero no se limitan a, carbohidratos, incluyendo glucosa, fructosa y sacarosa, y glicerol. El medio de cultivo líquido preferido para su uso en el presente documento se describe por Jackson (patente Estadounidense 5,968,808, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia). Los hongos del género *Trichoderma* producen microesclerocios cuando se cultivan en cultivo sumergido en el medio Jackson. Estos microesclerocios no han sido descritos hasta ahora para estos hongos. La fermentación puede llevarse a cabo utilizando técnicas de cultivo líquido aeróbico convencionales con agitación y aireación. Se prefiere la agitación para inhibir el crecimiento micelial en la pared del vaso. Las temperaturas adecuadas pueden oscilar entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 32 °C y el pH puede oscilar entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8. El intervalo de temperatura preferente para la fermentación es de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C. Una vez que se produce un crecimiento suficientemente fuerte del hongo que se ha obtenido, usualmente en aproximadamente 2-4 días, comienzan a formarse microesclerocios y se continúa la fermentación hasta que se obtiene una concentración suficientemente alta de microesclerocios. Sin limitarse a ello, en una modalidad preferente, la fermentación se continúa hasta que una proporción mayoritaria de los hongos viables en el cultivo (es decir, superior al 30% en peso), y más preferentemente hasta que una proporción predominante de los hongos viables en el cultivo (es decir, superior al 50% en peso) se diferencian para formar microesclerocios. Las condiciones de fermentación de alta pureza que se encuentran en algunas configuraciones de biorreactores pueden resultar en la rotura de microesclerocios en agregados de hifas melanizados más pequeños o en formulaciones mezcladas. Estos agregados de hifas o formulaciones mezcladas propagarían conidios.

Después de la finalización de la fermentación, los microesclerocios se pueden recuperar usando técnicas convencionales, tales como por filtración o centrifugación. Los microesclerocios pueden ser secados, tal como por secado al aire o por aplicación a semillas, a un nivel de humedad bajo, y almacenado a temperatura ambiente o inferior. En una modalidad preferente, la biomasa recuperada de la fermentación, después del secado, contendrá aproximadamente 1×10^5 o más microesclerocios por gramo de biomasa (basado en el peso en seco de la biomasa), particularmente por lo menos 1×10^6 microesclerocios por gramo de biomasa.

Se contempla que la producción comercial de microesclerocios por fermentación líquida se realizará por fermentación en un biorreactor. Las condiciones en el biorreactor forman cultivos tanto de microesclerocios como de conidios sumergidos mediante fermentación líquida. Se contempla que una persona con conocimientos ordinarios en la técnica sea capaz de controlar la formación de microesclerocios y conidios sumergidos controlando la tasa de oxígeno disuelto en el fermentador, dadas las enseñanzas de las condiciones de los medios descritos en el presente.

Las formulaciones comerciales para uso como biocontrol contra hongos patógenos pueden prepararse a partir de microesclerocios que se han cosechado del medio de cultivo tal como se describe en la presente memoria. Como cuestión práctica, se prevé que las formulaciones comerciales se pueden preparar directamente a partir del cultivo, obviando así la necesidad de cualquier etapa de purificación. Mientras que los cultivos líquidos pueden usarse directamente tales como en el recubrimiento de semillas, mezcla de envasado, en la modalidad preferente el agua se retira de los cultivos hasta una sequedad parcial o sustancial como se ha descrito anteriormente y el cultivo seco se rompe o muele en partículas pequeñas adecuadas para la aplicación a través de aplicadores convencionales de gránulos, utilizando técnicas convencionales en la técnica. Para facilitar la aplicación y subsecuente proliferación fúngica y conidiación, los microesclerocios cosechados pueden ser formulados de forma alternativa en un portador nutricional apropiado agronómicamente aceptable o portador inerte o vehículo para aplicación como polvos humectables, polvos, gránulos, cebos, soluciones, concentrados emulsionables, emulsiones, suspensiones concentradas y pulverizadores (aerosoles). Por ejemplo, para

aplicaciones líquidas, los microesclerocios pueden formularse como una suspensión o emulsión. En esta modalidad, los portadores preferentes incluyen, pero no se limitan a agua, tampones o aceites vegetales o aceites de plantas. En una modalidad alternativa preferente particularmente adecuada para aplicaciones granulares sólidas, los microesclerocios pueden formularse con portadores inertes sólidos o diluyentes tales como tierra de diatomeas, arcilla, vermiculita, CaCO_3 , mazorca de maíz, geles de alginato, matrices de almidón o polímeros sintéticas, o pueden incorporarse en micropartículas o microcápsulas de liberación controlada convencionales. El experto en la materia reconocerá que los hongos también pueden formularse en combinación con aditivos convencionales tales como agentes pegajosos o adherentes, agentes emulsionantes, tensoactivos, espumas, humectantes o agentes humectantes, antioxidantes, protectores UV, aditivos nutritivos, fertilizantes o insecticidas. Para la aplicación en semillas, corteza o follaje, y plantas, los microesclerocios se formulan también preferentemente con un adyuvante higroscópico o hidrófilico. Las formulaciones pueden tener concentraciones más bajas de microesclerocios en las que una persona con conocimientos ordinarios en la técnica utilice los microesclerocios como un producto agroquímico, biopesticida, plaguicida, fungicida, un aditivo para el crecimiento de plantas y bioestimulantes.

La cantidad absoluta de microesclerocios y su concentración en la composición final se seleccionan para proporcionar una reducción eficaz en hongos patógenos en comparación con un control no tratado. La cantidad real no es crítica y es una función de consideraciones prácticas tales como las propiedades del vehículo o portador, la densidad de los hongos patógenos, y el método y lugar de aplicación y puede determinarse fácilmente mediante pruebas de rutina. Por una composición que comprende un microesclerocio de una especie de *Trichoderma* con un portador agronómicamente aceptable que dicho microesclerocio, después de la rehidratación, germina hifalmente o esporogénicamente para producir conidios aéreos, para efectos de la formulación y aplicación, se define que una "cantidad eficaz" significa cualquier cantidad de microesclerocios suficientes para producir subsecuentemente suficientes conidios en el hábitat objetivo para infectar y matar los hongos patógenos blanco en relación con un control no tratado. A modo de ejemplo y sin limitarse a ello, se contempla que las formulaciones adecuadas contendrán típicamente aproximadamente 1×10^5 o más

microesclerocios por gramo de biomasa recuperada del cultivo líquido (basado en el peso seco de la biomasa), preferentemente al menos 1×10^6 microesclerocios por gramo de biomasa.

5 En uso, los microesclerocios de esta invención se pueden aplicar a la vecindad o en la superficie de las plantas a proteger, por ejemplo, sobre la corteza de los árboles, o como recubrimiento de semillas, usando técnicas convencionales. En una modalidad preferente, los microesclerocios se aplican al suelo, o a mezclas de sustrato sin tierra para macetas tales como las que se usan en invernaderos, en una forma granular. Dependiendo
10 de la plaga de hongos objetivo, los microesclerocios pueden aplicarse en huertos agrícolas, invernaderos, jardines o céspedes, o en o cerca de plantas ornamentales, árboles o estructuras comerciales o residenciales como antagonista contra los hongos patógenos de plantas.

15 En otra modalidad de la invención, el microesclerocio puede aplicarse en la vecindad o en la superficie de las plantas para promover el crecimiento y la salud de las plantas.

La cantidad absoluta de microesclerocios y su concentración en la composición final
20 se seleccionan para proporcionar una reducción eficaz en los hongos patógenos o aumentar la salud de las plantas en comparación con un control no tratado. La cantidad real no es crítica y es una función de consideraciones prácticas tales como las propiedades del vehículo o portador, la densidad de los hongos patógenos, y el método y lugar de aplicación y puede determinarse fácilmente mediante pruebas de rutina. Por motivos de
25 formulación y aplicación, se define que una "cantidad eficaz" significa cualquier cantidad de microesclerocios suficiente para producir posteriormente suficiente crecimiento de hifas o conidios en el hábitat objetivo para inhibir el crecimiento y la infectividad de los hongos patógenos en relación con un control no tratado. A título de ejemplo y sin limitarse a ello, se prevé que las formulaciones adecuadas contendrán típicamente aproximadamente $1 \times$
30 10^5 o más microesclerocios por gramo de biomasa recuperada del cultivo líquido (basado en el peso seco de la biomasa), preferentemente al menos 1×10^6 microesclerocios por gramo de biomasa.

Los microesclerocios de las especies de *Trichoderma* descritas aquí producen hifas y conidios aéreos eficaces para el control de patógenos de plantas. Sin limitarse a ello, el patógeno vegetal que puede ser controlado por los microesclerocios de esta invención incluye, pero no se limita a, varias especies de *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Phytophthora*, *Castenea*, *Armillaria*, *Pythium* y *Thielaviopsis*.

Análisis estadístico

Cada experimento se llevó a cabo con un diseño completamente al azar y se repitió al menos tres veces. Se utilizaron paquetes R (R Core Team, 2012. R: *A language and environment for statistical computing*, R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria) y *lme4* (Bates DM, Maechler M, Bolker B, 2012. lme4: Modelos lineales de efectos mixtos utilizando las clases S4. Paquete R versión 0.999999-0. Disponible en <http://cran.stat.sfu.ca/web/packages/lme4/lme4.pdf>) para realizar análisis de efectos lineales mixtos para los datos de mediciones repetidas para tratar los efectos del medio de cultivo y el tiempo en la acumulación de biomasa, concentración de conidios sumergidos, concentración de microesclerocios, producción de conidios a partir de microesclerocios secos y viabilidad de conidios. Para los estudios de fermentación líquida, el tratamiento (es decir, el medio de cultivo), el tiempo (es decir, el día de fermentación o el período de almacenamiento) y su término de interacción se introdujeron como efectos fijos en el modelo. Como efectos aleatorios, el matraz de agitación (es decir, sujeto o réplica) fue sometido a observaciones repetidas a lo largo del tiempo y repetición experimental para explicar cualquier variación entre experimentos llevados a cabo en fechas diferentes. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado de razón de probabilidad para abordar la importancia de los efectos fijos y su interacción en los modelos lineales mixtos mediante la estimación de sus valores de *P* mediante comparación de modelos anidados (Pinheiro JC, Bates DM, 2000. *Mixed Effects Models in S and SPLUS*. Nueva York: Springer. R Core Team, 2012. R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). Los datos de producción de conidios sumergidos y de microesclerocios se transformaron por $\log_{10}(x + 1)$ cuando era necesario para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de los datos antes del análisis. Las comparaciones múltiples post-hoc se llevaron a cabo utilizando la función *ghlt* en el paquete

multcomp para comparar los tratamientos, corrigiendo los valores P para las comparaciones múltiples mediante el método de un solo paso. La viabilidad de conidios sumergidos (% de germinación) registrada antes y después del secado al aire (es decir, dos muestras dependientes) se comparó por la prueba t -Student apareada para tener en

5 cuenta el impacto de la tolerancia a la desecación sobre la supervivencia de los conidios sumergidos dentro de cada tratamiento. Para el conjunto de datos longitudinales sobre la estabilidad de almacenamiento de los microesclerocios, medidos por la producción de conidios a lo largo del tiempo, el tratamiento (= medio de cultivo) y el tiempo (meses) fueron

ajustados como efectos fijos, mientras que los paquetes de muestras (es decir, sujetos)

10 fueron considerados como un efecto aleatorio en un modelo lineal mixto. Luego se compararon las pendientes para las curvas de estabilidad de almacenamiento usando una matriz de contraste para evaluar las diferencias entre los tratamientos. Los datos de estabilidad de almacenamiento de conidios sumergidos fueron ajustados por un modelo exponencial de decaimiento usando la función *nls*, y las comparaciones entre modelos no

15 lineales se realizaron mediante la prueba de reducción en la suma de los cuadrados (Ratkowsky D, 1990. *Handbook of Nonlinear Regression Models*, New York and Basel: Marcel Dekker).

El efecto de los tratamientos del suelo sobre la proporción de plántulas de melón

20 muertas por marchitamiento causado por *R. solani* se evaluó mediante el análisis de supervivencia (Kaplan EL, Meier P, 1958). Estimación no paramétrica de observaciones incompletas. *Journal of the American Statistical Association* 53 (282): 457–481). Las plántulas que sobrevivieron más allá del día 15 fueron consideradas censuradas. Las diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia de los

25 tratamientos se estimaron mediante la prueba del rango logarítmico (paquete de supervivencia) con valores P ajustados por Bonferroni. Los datos de la proporción de plántulas emergente y las plántulas sanas totales registradas al día 15 se analizaron mediante un modelo lineal mixto generalizado (glmer) con tratamientos con efecto fijo,

mientras que los contenedores (repeticiones) y los bioensayos (repeticiones

30 experimentales) se registraron como efectos aleatorios.

Aislamientos de *Trichoderma*

En este estudio se utilizó la cepa T-22 de *Trichoderma harzianum* Rifai (ATCC 20847; Rootshield®, BioWorks, Inc., Geneva, NY). Se aislaron cultivos puros de *T. harzianum* a partir de diluciones seriadas de Rootshield® y se cultivaron en agar de dextrosa de patata (PDA, Difco®) a 25 ± 1 °C por al menos 7 días. Las colonias individuales se purificaron mediante re-aislamiento en PDA y una única punta de hifa se aisló y cultivó en PDA. El análisis molecular del aislamiento de *Trichoderma* confirmó que la cepa era *T. harzianum* T-22 (ATCC 20847). La colonia esporulada procedente de esta punta de hifa se usó como cultivo de reserva de *T. harzianum* T-22 y se cortó en trozos de 1 mm², se colocó en crio-viales que contenían glicerol al 10% y se almacenó a –80 °C.

Se probaron otras especies de *Trichoderma* tomadas de la colección de cultivos de la USDA, *Agricultural Research Service*, en Peoria, Illinois. Principalmente *Trichoderma harzianum* (NRRL 13879), *T. harzianum* (NRRL 13019), *T. harzianum* (NRRL A-24290), *T. lignorum* (NRRL 1762), *T. viridae* (NRRL A 23264), *T. reesei* (NRRL 6156), *T. koningii* (NRRL A - 18871), *T. pseudokoningii* (NRRL 22083) y *T. polysporum* (NRRL 28981). Los cultivos de reserva de cada cepa de *Trichoderma* spp. se cultivaron como aislados de esporas individuales sobre agar de dextrosa de patata (PDA) durante tres semanas a temperatura ambiente. La placa esporulada se cortó en tapones de agar de 1 mm² y se almacenaron cultivos de estos tapones de agar almacenados en glicerol al 10% a –80 °C. Se produjeron inóculos de conidios para experimentos de cultivo líquido inoculando placas de PDA con una suspensión de conidios de los cultivos de reserva congelados y cultivando estos cultivos a temperatura ambiente (–22 °C) durante 2-3 semanas. Se inocularon todos los cultivos líquidos a una concentración inicial de 5×10^6 conidios ml⁻¹ de caldo de cultivo.

Para los estudios de cultivo líquido, se obtuvieron inóculos de conidios inoculando placas de PDA con una suspensión de conidios de los cultivos de reserva congelados y cultivando los cultivos a 25 ± 1 °C durante 2–3 semanas. Se obtuvieron suspensiones conidiales a partir de placas de agar esporuladas mediante el enjuague de las placas con 10 mL de una solución estéril que contenía 0,04% de mono-oleato de polioxietilensorbitano (Tween 80, Sigma®).

El crecimiento y la formación de propágulos por *T. harzianum* se evaluó en medios líquidos que contenían diferentes concentraciones de carbono, relaciones de carbono a nitrógeno (C:N) y fuentes de nitrógeno usando un medio líquido semi-definido compuesto de sales basales con glucosa (Sigma®) e hidrolizado ácido de caseína (Casamino acids®, Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.) como fuente de carbono y nitrógeno. El medio de sales basales definido utilizado en todos los cultivos líquidos contenía por litro de agua doblemente desionizada (Jackson MA, McGuire MR, Lacey LA, Wraight SP, 1997. Producción de cultivo líquido de blastoesporas tolerantes a la desecación del hongo bioinsecticida *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycological Research* 101: 35–41) KH_2PO_4 , 2,0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 37 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 16 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14 mg; tiamina, riboflavina, pantotenato, niacina, piridoxamina, ácido tióctico, 500 µg cada uno; y ácido fólico, biotina, vitamina B₁₂, 50 µg cada uno. Las cantidades de glucosa e hidrolizado ácido de caseína y las correspondientes concentraciones de carbono y relaciones de C:N se muestran en la Tabla 1 para cada medio de cultivo probado. Los cálculos de la concentración de carbono y las relaciones de C:N se basaron en el 40% de carbono en glucosa y 53% de carbono, y 8% de nitrógeno en hidrolizado ácido de caseína.

Todos los cultivos se cultivaron en 100 mL de medio líquido utilizando matraces de Erlenmeyer de 250 mL con un deflector (Bellco Glass, Vineland, NJ, EE.UU.), incubados a 28 °C y 300 rev.min⁻¹ (rpm) en una incubadora con agitación rotatoria con una tirada horizontal de 1,9 cm (INNOVA 4000, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EE.UU.). Durante el período de fermentación, los matraces se agitaron con frecuencia con la mano para evitar el crecimiento micelial en la pared del matraz. Para los estudios de la concentración de carbono y las relaciones de C:N, los medios fueron inoculados con una suspensión de conidios obtenida de una placa de agar de *T. harzianum* esporulado con 2–3 semanas de crecimiento ajustada para proporcionarle al medio una concentración final de 5×10^5 conidios mL⁻¹. Dos, 4 y 7 días después de la incubación, se tomaron muestras de 3 mL para medir las concentraciones de biomasa, conidios sumergidos y microesclerocios. Para cada experimento, se tomaron muestras duplicadas de cada matraz en cada fecha de muestreo, y se usaron dos matraces duplicados para cada tratamiento en los estudios. Los experimentos se repitieron cuatro veces.

Diferentes Fuentes de Nitrógeno

Se evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno para su uso en cultivos de *T. harzianum* basados en la acumulación de biomasa y en la formación de propágulos. Las fuentes de nitrógeno se añadieron al medio de sales basales con glucosa para producir un medio con una relación C:N de 50:1 y una concentración de carbono de 36 g L⁻¹ correspondiente al medio 6 del experimento anterior (ver Tabla 1). Además, se probó una formulación de medio que contenía melaza en polvo (BioSev Ltd., Sao Paulo, SP, Brasil) con aproximadamente 40% de carbono como sustituto de la glucosa como principal fuente de carbono. Los subproductos basados en proteínas probados fueron soja (Toast Nutrisoy®, ADM Co., Decatur, IL, EE.UU.), harina de semilla de algodón (Pharmamedia®, ADM, Memphis, TN, EE.UU.), extracto de levadura (Difco®, Detroit, MI, EE.UU.) y polvo de licor compacto (Solulys® AST, Roquette Corporation, Gurnee, IL, EE.UU.). Todas las composiciones de los medios seguidas por su contenido de nitrógeno se muestran en la Tabla 2. Para las evaluaciones de la fuente de nitrógeno, se obtuvo un inóculo de conidios de *T. harzianum* a partir de placas de PDA esporuladas para proporcionarle al medio una concentración final de 5 × 10⁶ conidios mL⁻¹. Se ensayaron dos velocidades de agitación de 300 o 350 rpm y se consideró un segundo factor en el diseño experimental. Las muestras se tomaron después de 2 y 4 días de crecimiento y se midió la acumulación de biomasa, las concentraciones de conidios sumergidos y microesclerocios. Cada tratamiento se realizó por duplicado y los experimentos se repitieron tres veces.

Para completar los estudios de la fuente de nitrógeno, se inoculó el medio de sales basales que contenía harina de semillas de algodón como fuente de nitrógeno (proporción C:N de 30:1 y 10:1 con una concentración de carbono de 36 g L⁻¹) con un pre-cultivo de *T. harzianum* de 3 días cultivado en un medio 6 (Tabla 1). Los pre-cultivos fueron inoculados con conidios usando los métodos descritos anteriormente. Los experimentos fueron repetidos tres veces.

Tabla 1 – Composición de los medios basados en la concentración de carbono (g L⁻¹) y la proporción carbono-nitrógeno (C:N) utilizada para evaluar el crecimiento, la formación de propágulos y los rendimientos de *Trichoderma harzianum* T-22.

Designación del Medio Líquido	Carbono (g L ⁻¹)	Relación C:N	Glucosa (g L ⁻¹)	Hidrolizado ácido de caseína (g L ⁻¹)
1	8	10:1	10,0	10,0
2	8	30:1	16,6	3,4
3	8	50:1	18,0	2,0
4	36	10:1	45,0	45,0
5	36	30:1	75,0	15,0
6	36	50:1	81,0	9,0

Crecimiento y formación de los propágulos

Se tomaron muestras de tres mL en varios momentos durante el crecimiento para medir la acumulación de biomasa y las concentraciones de conidios y microesclerocios. Para todos los muestreos se utilizaron puntas de pipeta de plástico de 1 mL de diámetro (la punta se extrajo con una hoja de afeitar para crear una abertura más ancha). Para las mediciones de acumulación de la biomasa, se tomó 1 mL del caldo de cultivo entero de los matraces y se separó la biomasa del medio gastado mediante una filtración al vacío en discos de filtro previamente pesados (fibra de vidrio de 2,4 cm G6, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EE.UU.). La acumulación de peso seco se determinó secando la biomasa y el disco de filtro a 60 °C hasta un peso constante antes de la medición. Las concentraciones de conidios sumergidos se determinaron microscópicamente usando un hemocitómetro. Para las mediciones de la concentración de microesclerocios, se colocaron 100 µL de caldo de cultivo sobre un portaobjetos de vidrio y se cubrió con un cubreobjetos grande de 24 × 50 mm (Fisher Scientific, EE.UU.). Todos los microesclerocios en el portaobjetos fueron contados microscópicamente. Sólo los agregados de hifas discretos y compactos de más de 50 µm de diámetro se contaron como microesclerocios. El caldo de cultivo se diluyó según fuera apropiado para facilitar el conteo de microesclerocios. Durante el muestreo y la dilución del caldo de cultivo, las suspensiones de microesclerocios se agitaron constantemente para asegurar la homogeneidad. No se pudo utilizar un hemocitómetro para contar los microesclerocios debido a su gran tamaño. Todos los análisis microscópicos se realizaron utilizando un microscopio Olympus BH-2 con óptica Nomarski.

Tabla 2- Evaluación de medios que contienen diferentes fuentes de nitrógeno, medio líquido 6 (36 g de carbono L⁻¹, proporción C:N de 50:1).

Fuente de Carbono	Proteína (% de nitrógeno)	Nombre Comercial	Fabricante
Glucosa	Hidrolizado ácido de caseína (8)	Casamino acids®	Difco
Glucosa	Harina de soya (8,5)	Toasted Nutrisoy®	ADM, Decatur, IL, EE.UU.
Glucosa	Harina de semilla de algodón (9,5)	Pharmamedia®	Traders Protein Memphis, TN. EE.UU.
Glucosa	Levadura autolizada (8)	Yeast extract®	Difco
Glucosa	Licor de maíz fermentado (7,2-8,2)	Solulys® AST	Roquette Corp., Gurnee, IL, EE.UU.
Melaza	Hidrolizado ácido de caseína (8)	Casamino acids®	Difco

EJEMPLO 1 Formulación, tolerancia a la desecación y estabilidad al almacenamiento de *T. harzianum*

5 En los estudios de evaluación del media, se muestrearon cultivos de la cepa T-22 de *T. harzianum* como se describió anteriormente en los días 2 y 4 y se recolectaron al día 7. En la recolecta del día 7, la tierra de diatomeas [DE (HYFLO[®], Celite Corp., Lompoc, CA, EE.UU.)] se añadió a la biomasa de hongos de cada matraz que contenía microesclerocios y/o conidios sumergidos a una concentración de 5 g DE 100 mL⁻¹ caldo
10 de cultivo. Las mezclas de biomasa de cultivo - DE se filtraron al vacío en un embudo Buchner usando papel de filtro Whatman No. 1. La torta de filtración resultante se rompió pulsando en una mezcladora (Mini Prep[®] Plus, Cuisinart, Stamford, CT, EE.UU.), se colocó en capas en placas de Petri y se secó al aire durante una noche a ~22 °C con una humedad relativa (hr) de 50–60%. El contenido de humedad de las preparaciones de
15 microesclerocios–DE se determinó con un analizador de humedad (Mark II, Denver Instruments, Arvada, CO, EE.UU.) junto con sus correspondientes actividades hídricas, medidas a una temperatura equilibrada de 25 °C (AquaLab series 4TEV, Decagon Devices Inc., Pullman, WA, EE.UU.). Cuando las formulaciones de *T. harzianum* se secaron hasta un contenido de humedad inferior al 4% (actividad hídrica <0,35), las formulaciones secas
20 se envasaron al vacío en bolsas de polietileno de nylon (15,3 × 21,8 cm) con un envasador al vacío (Multivac C 100, Sepp Haggenmüller, Wolfertschwenden, Alemania) y se almacenaron a 4 °C.

 Para comparar la estabilidad de almacenamiento de los microesclerocios de
25 *Trichoderma* a temperatura ambiente y refrigerados, se cultivaron 100 mL de cultivos de *T. harzianum* T-22 en una relación C:N de 10:1 y 30:1 con harina de semilla de algodón como fuente de nitrógeno, se recolectaron el día 4, se formularon con DE al 5% (p/v), y se secaron al aire hasta menos del 4 % de humedad. Las formulaciones de microesclerocios secadas al aire se envasaron al vacío en bolsas de Mylar aluminizadas de 15 × 22 cm
30 (PAKVF4, IMPAK Corporation, Los Ángeles, CA, EE.UU.) y se mantuvieron en condiciones ambientales (25 °C) o refrigeradas (4 °C).

 Para probar la viabilidad de los microesclerocios y la producción de conidios sumergidos, se adaptó la metodología de Jackson MA, Jaronski ST, 2009. La producción
35 de microesclerocios del entomopatógeno fúngico *Metarhizium anisopliae* y su potencial para uso como agente de biocontrol para insectos que habitan el suelo. *Mycological*

Research 113: 842–850. En breve, se inocularon 25 mg de preparaciones secas de microesclerocios–DE de *T. harzianum* en placas de agar de agua (2% p/v) y se incubaron a 25 °C. Tras la rehidratación, los gránulos de microesclerocios germinaron miceliogénicamente (formación de tubo germinal) y esporogénicamente (producción de conidios). Se utilizaron dos placas de agar de agua (submuestras) para cada réplica del tratamiento. Después de una incubación de 24 h a 25 °C, se examinaron cien gránulos de microesclerocios–DE por placa con un estéreo microscopio (Olympus, modelo SZH10) para determinar la germinación de hifas como medición de viabilidad. Para enumerar la producción de conidios, las placas de agar de agua se mantuvieron a 25 °C durante un total de siete días. A continuación, cada placa se inundó con 7 mL de solución de Tween 80 al 0,04% y los conidios se desalojaron de los gránulos de microesclerocios–DE usando una asa estéril. Después de desalojar los conidios, se pipeteó el líquido disponible de cada placa y se midió el volumen de líquido. La concentración de conidios en el líquido pipeteado se midió microscópicamente usando un hemocitómetro y se calculó el número total de conidios por placa. Para determinar el número de conidios de *T. harzianum* producidos por gramo de preparación de microesclerocios–DE secada al aire, se dividió el número de conidios cosechados por placa por el peso de la preparación seca de microesclerocios–DE añadida a cada placa de agar de agua (0,025 g).

Para los ensayos de viabilidad de conidios sumergidos, se diluyeron 0,01 g de cada formulación de conidios-DE sumergidos seca en 10 ml de Tween 80 al 0,04% (Sigma®), se agitaron por vórtex durante 1 min y se dejaron sedimentar las partículas DE durante 1 min. Se inocularon dos alícuotas de 100 µL del sobrenadante que contenía principalmente conidios sumergidos en placas de agar de agua (1% agar p/v) para suministrar aproximadamente 1×10^5 conidios sumergidos por placa. Los estudios preliminares no revelaron diferencias significativas entre PDA y agar de agua para la evaluación de la germinación. La germinación se evaluó microscópicamente mediante la evaluación de 200 conidios sumergidos por placa de agar de agua utilizando un microscopio invertido (Olympus IMT-2) después de 16 horas de incubación a 25 °C. Los conidios sumergidos se consideraron germinados cuando el tubo germinal era mayor que el diámetro del conidio. La tolerancia a la desecación se expresó como porcentaje de supervivencia de conidios sumergidos y cada replicación del tratamiento tenía dos submuestras. Se realizaron evaluaciones adicionales mensualmente hasta que la viabilidad de las esporas fue menor al 40%.

En condiciones de cultivo en matraz agitado, se observó la formación de conidios sumergidos y microesclerocios de *T. harzianum* T-22 durante un período de fermentación de 7 días en medio de cultivo líquido con diferentes relaciones de C:N. Los microesclerocios de *T. harzianum* se formaron y desarrollaron exclusivamente en medios con alto contenido de carbono (36 g L^{-1}), independientemente de la relación C:N ensayada. El medio más rico (# 4) con una relación C:N de 10:1 carecía de producción de conidios sumergidos, pero promovió el desarrollo de microesclerocios. Los microesclerocios totalmente formados de *T. harzianum* tenían un diámetro de 90–600 μm . De acuerdo con el modelo de efectos lineales mixtos para explicar mediciones repetidas en el tiempo, la producción de microesclerocios por *T. harzianum* fue afectada tanto por el medio de cultivo ($\chi^2_{(15)} = 264,84, P < 0,0001$) como por el tiempo de fermentación ($\chi^2_{(12)} = 32,09, P = 0,0013$). La interacción entre el tiempo de fermentación y el medio de cultivo contribuyó en gran medida a la variación en las tasas de producción de microesclerocios ($\chi^2_{(12)} = 20,78, P = 0,023$) (Tabla 3). En general, se produjeron más microesclerocios en el día 4 en todos los medios de cultivo ($2,6\text{--}4,8 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, con menos microesclerocios observados en el día 7, probablemente debido a la agregación de los microesclerocios. Los microesclerocios de *T. harzianum* comenzaron a formarse después de 48 h de crecimiento con los microesclerocios convirtiéndose cada vez más bien definido y compactos al día 4 y la melanizados al día 7. Mientras que los microesclerocios eran más compactos y melanizados, estas estructuras presentaron extensiones hifales cortas que emanan de su superficie. Se observaron concentraciones de microesclerocios al día 4 en los medios 4 y 5, mientras que en el medio 6 al día 2 se presentó un mayor número de microesclerocios inmaduros.

La conidiación sumergida fue soportada por todos los medios ensayados excepto el medio 4 que produjo solo microesclerocios. Estos conidios sumergidos estaban formados por células conidiógenicas (por ejemplo, fiálides) unidas a hifas sumergidas en etapas tempranas (día 2) de crecimiento, especialmente cuando el hongo se cultivaba en un medio débil ($8 \text{ g de carbono L}^{-1}$). Después de 4 días de crecimiento, los conidios sumergidos se produjeron en altas concentraciones en aquellos cultivos con altas concentraciones de carbono y concentraciones de nitrógeno más bajas (relaciones C:N de 50:1, 30:1; Tabla 3). Las tasas de producción de conidios sumergidos fueron significativamente afectadas por la interacción del medio de cultivo $\times$ tiempo de

fermentación ($\chi^2_{(15)} = 904,97$, $P < 0,0001$). En todos los medios de cultivo se observó un aumento general significativo de la producción de conidios sumergidos ($\chi^2_{(12)} = 980,8$, $P < 0,0001$), con un mayor número de conidios sumergidos alcanzado al día 7. Los medios 1, 2 y 3 que contenían concentraciones más bajas de carbono alcanzaron la máxima producción de conidios sumergidos al día 4 ($1,6\text{--}3,2 \times 10^8$ conidios mL^{-1}), mientras que los medios 5 y 6 ricos en carbono alcanzaron la máxima producción al día 7 ($3,9\text{--}9,7 \times 10^8$ conidios mL^{-1}). Las mayores concentraciones de conidios sumergidos observadas en los medios ricos en carbono era esperadas ya que la mayor disponibilidad de nutrientes en estos medios promueve un mejor crecimiento vegetativo y posterior conidiación ($\chi^2_{(15)} = 1028,2$, $P < 0,0001$). Los cultivos de *T. harzianum* crecidos en medios limitados en carbono (medios 1, 2 y 3) produjeron grandes cantidades de conidios sumergidos en 2 días ($6,5\text{--}7,7 \times 10^7$ conidios mL^{-1}), mientras que el medio 6 (relación C:N de 50:1 y 36 g de carbono L^{-1}) produjo significativamente más conidios sumergidos ($9,7 \times 10^8$ conidios mL^{-1} al día 7.

TABLA 3 - Evaluación de conidios sumergidos, microesclerocios (MS) y producción de biomasa por cultivo de *Trichoderma harzianum* T-22 cultivado en medios con diferentes relaciones de C:N y concentraciones de carbono a 28 °C y 300 rpm en una incubadora con agitación.

Medio	Carbón (g L ⁻¹)	Relación C:N	Conidios sumergidos (× 10 ⁷ conidios mL ⁻¹)			Microesclerocios (× 10 ³ MS mL ⁻¹)		
			Día 2	Día 4	Día 7	Día 2	Día 4	Día 7
1	8	10:1	6,5 a [†]	25,4 ab	27,1 bc	0 b	0 b	0 b
2	8	30:1	7,7 a	32,1 a	33,6 b	0 b	0 b	0 b
3	8	50:1	3,4 b	15,8 b	20,5 c	0 b	0 b	0 b
4	36	10:1	0 c	0 c	0 d	27,8 a	48,3 a	15,3 a
5	36	30:1	0 c	0 c	39,1 b	22,2 a	33,3 a	16,6 a
6	36	50:1	0 c	49,9 a	95,5 a	32,8 a	25,8 a	25,9 a

Medio	Carbón (g L ⁻¹)	Relación C:N	Biomasa (mg mL ⁻¹)		
			Día 2	Día 4	Día 7
1	8	10:1	7,7 e	5,6 e	4,9 d
2	8	30:1	5,0 d	7,1 e	8,5 e
3	8	50:1	3,5 d	4,7 d	4,5 d
4	36	10:1	10,0 b	16,1 a	19,3 a
5	36	30:1	12,4 a	16,3 a	16,8 b
6	36	50:1	10,4 b	13,4 b	16,3 b

[†]Los medios seguidos por diferentes letras dentro de una columna son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

La acumulación de biomasa (mg mL^{-1}) siguió el patrón predicho en que el crecimiento fúngico en medios limitados en carbono (8 g L^{-1}) dio como resultado menos biomasa en comparación con cultivos crecidos en medios con $36 \text{ g de carbono L}^{-1}$, independiente de la relación C:N (Tabla 3). Esta diferencia fue significativa por la interacción del medio de cultivo y el tiempo de fermentación ($\chi^2_{(10)} = 122,95$, $P < 0,0001$). Los medios 4, 5 y 6 que contenían mayores concentraciones de carbono indujeron una

mayor acumulación de biomasa a lo largo del tiempo ($\chi^2_{(12)} = 185,4$, $P < 0,0001$). Como era de esperar, el medio 4 produjo la mayor cantidad de biomasa en todos los días de evaluación, con las mayores concentraciones de carbono y nitrógeno (C:N = 10:1 y 36 g L⁻¹ de carbono) ($\chi^2_{(15)} = 247,14$, $P < 0,0001$). La biomasa fúngica disminuyó linealmente con los días de fermentación para el medio 1, el medio más pobre en carbono y nitrógeno. El examen microscópico reveló que el crecimiento de hifas aumentó con el tiempo en los medios ricos en carbono seguido por la rápida formación de microesclerocios.

Tolerancia a la desecación y estabilidad al almacenamiento de los propágulos de *T. harzianum* T-22

T. harzianum T-22 se prepararon como se ha descrito anteriormente. Después de 7 días de crecimiento, todos los cultivos de *T. harzianum* procedentes de los estudios de relaciones C:N se secaron al aire hasta un 0,8 a 3,8% de humedad con mediciones correspondientes de actividad hídrica (Aw) en un intervalo de 0,35 – 0.41 y se envasaron al vacío para almacenamiento a 4 °C. Tras la rehidratación y la incubación durante 24 h, un 100% de los gránulos de microesclerocios secos germinaron hifalmente y se comenzaron a producir conidios aéreos en las extensiones hifales y en la superficie de los gránulos de microesclerocios, como se observó por su coloración verdosa clara. Estos gránulos de microesclerocios continuaron germinando esporogénicamente produciendo conidios estando dicha producción influenciada por el medio de cultivo para los gránulos de microesclerocios secados al aire ($\chi^2_{(2)} = 31,08$, $P < 0,0001$). Los gránulos de microesclerocios obtenidos a partir de medios con una relación C:N de 10:1 produjeron 35% y 52% más conidios en comparación con los gránulos de microesclerocios cosechados de medios con relaciones C:N de 30:1 y 50:1, respectivamente (**Fig. 1**). Para los gránulos de microesclerocios secos almacenados a 4 °C, la producción de conidios estuvo significativamente afectada tanto por el medio de cultivo ($\chi^2_{(4)} = 98,4$, $P < 0,0001$) como por el período de almacenamiento ($\chi^2_{(3)} = 47,2$, $P < 0,0001$). Dado que la interacción de estos dos factores también fue significativa ($\chi^2_{(2)} = 13,23$, $P = 0,0013$), las pendientes de las curvas de estabilidad de almacenamiento fueron estadísticamente diferentes, lo que indica una variación considerable en la producción de conidios a lo largo del tiempo de almacenamiento a través de los medios de cultivo ensayados. El patrón de estabilidad de almacenamiento a 12 meses (**Fig. 1**), medido como la producción de conidios a partir de gránulos de microesclerocios rehidratados difería sólo entre el medio 4 (relación C:N de 10:1) y el medio 6 (relación C:N de 50:1), mientras que no hubo diferencias en la

producción de conidios temporales entre el medio 5 (relación C:N de 30:1) y los otros ($P > 0,05$). La producción de conidios por gránulos de microesclerocios cosechados a partir de medios con una relación C:N de 10:1 y 36 g de carbono L^{-1} (medio 4) permaneció alta ($1,13\text{--}2,03 \times 10^{10}$ conidios g^{-1}) durante 12 meses de almacenamiento con un aumento significativo en la producción de conidios después de 6 meses de almacenamiento. Los gránulos de microesclerocios del medio con relación C:N de 30:1 presentaron la segunda producción de conidios más alta, mientras que los producidos en el medio 6 (relación C:N de 50:1) alcanzaron el menor rendimiento. A pesar de las diferencias en la producción de conidios por gránulos por de microesclerocios de diferentes medios de cultivo, la producción de conidios para cada tratamiento no se redujo con el tiempo, lo que indica que estos gránulos de microesclerocios permanecieron estables bajo almacenamiento refrigerado por hasta 12 meses.

La viabilidad y estabilidad de los conidios sumergidos producidos en diferentes medios de cultivo y cosechados después de 7 días de crecimiento se evaluaron antes y después del secado y luego 1, 2 y 12 meses después del almacenamiento a 4 °C. Sólo los conidios sumergidos producidos en el medio 2 (8 g de carbono L^{-1} , relación C:N de 30:1) no sufrieron una reducción significativa de la germinación después del secado en comparación con los conidios sumergidos frescos ($t_{(5)}$ apareada = 1,23, $P = 0,273$), Mientras que los conidios sumergidos de los otros medios ensayados mostraron una tolerancia a la desecación significativamente menor (prueba t apareada: $P < 0,01$) (**Fig. 2**). Los conidios sumergidos frescos del medio 1 (nutrientes limitados) tuvieron la tasa de germinación más alta (84,3% de viabilidad) para los conidios frescos sumergidos pero la tolerancia a la desecación más baja (2,1% de viabilidad) (**Fig. 2**). Se utilizó un modelo de decaimiento exponencial no lineal para explicar la relación entre el tiempo de almacenamiento y la viabilidad de los conidios sumergidos en cada tratamiento con una confiabilidad de $R^2 = 0,75\text{--}0,81$. De acuerdo con los modelos ajustados a nuestros datos de viabilidad experimental registrados en el tiempo, las vidas media de los conidios sumergidos almacenados se estimaron en 1,93, 1,05, 1,26 y 1,81 meses cuando se fueron cosechados en los medios 2, 3, 5 y 6, respectivamente. El medio 2 (bajo contenido de carbono y relación C:N de 30:1) y 6 (alto contenido de carbono, bajo contenido de nitrógeno, relación C:N de 50:1) mostraron las mayores tasas de germinación al mes 2, aunque la viabilidad disminuyó significativamente después de 12 meses de almacenamiento con los conidios sumergidos del medio 3 (bajo carbono y relación C:N de

50:1) siendo el más viable (41% de supervivencia). Una comparación de las curvas de supervivencia mostró que los conidios sumergidos cosechados del medio 3 sobrevivieron más tiempo en almacenamiento cuando se compararon con los conidios sumergidos producidos en los otros medios ($P < 0,01$).

5

EJEMPLO 2. Efecto de la velocidad de agitación y de las fuentes de nitrógeno en la fermentación líquida de *T. harzianum* T-22

10 Los estudios de fermentación con diferentes fuentes de nitrógeno a concentraciones de nutrientes conducentes a la formación de microesclerocios revelaron que la formación de microesclerocios se producía en grados variables con todas las fuentes de nitrógeno ensayadas (Tabla 4). La sustitución de la melaza por glucosa como fuente de carbono inhibió la formación de microesclerocios. Todas las fuentes de carbono y nitrógeno
15 probadas a 50:1 (relación C:N) con 36 g de carbono L⁻¹ dieron lugar a la producción tanto de conidios sumergidos como de microesclerocios, con la excepción del tratamiento con melaza que produjo sólo conidios sumergidos. El aumento de la velocidad de agitación de 300 a 350 rpm no afectó la producción de conidios sumergidos ($\chi^2_{(1)} = 3,11$, $P = 0,08$), los rendimientos de microesclerocios ($\chi^2_{(1)} = 1,06$, $P = 0,302$), o la acumulación de biomasa
20 ($\chi^2_{(1)} = 2,16$, $P = 0,142$). Así, los datos experimentales obtenidos durante el crecimiento a 300 y 350 rpm se agruparon para su análisis. En base a los rendimientos de microesclerocios, la harina de semilla de algodón combinada con glucosa a razón de 36 g de carbono L⁻¹ y C:N de 50:1 produjo un número significativamente mayor de microesclerocios del día 2 al 4 comparado con los otros compuestos de nitrógeno
25 ensayados ($\chi^2_{(10)} = 137,56$, $P < 0,0001$, Tabla 4). En general, la formación de microesclerocios se incrementó durante el tiempo de fermentación, independientemente de la fuente de nitrógeno empleada ($\chi^2_{(6)} = 34,14$, $P < 0,0001$). La interacción del medio de cultivo $\times$ días de fermentación tuvo un impacto significativo sobre la producción de microesclerocios ($\chi^2_{(5)} = 13,17$, $P = 0,022$), lo que indica que las tasas de crecimiento de
30 microesclerocios se diferenciaron según los medios de cultivo.

35

TABLA 4 - Evaluación de conidios sumergidos, microesclerocios (MS) y producción de biomasa por cultivo de *Trichoderma harzianum* T-22 cultivado en un medio de cultivo líquido con diferentes fuentes de nitrógeno, una relación C:N de 50:1 y una concentración de carbono de 36 g L⁻¹. Los cultivos se incubaron a 28 °C y a 300 o 350 rpm en una incubadora con agitación rotatoria.

Fuente de Carbono	Fuente de Nitrógeno	Conidios sumergidos (× 10 ⁷ conidios mL ⁻¹)		Microesclerocios (× 10 ³ MS mL ⁻¹)	
		Día 2	Día 4	Día 2	Día 4
Glucosa	Hidrolizado ácido de caseína	33,3 a [†]	80,5 a	25,4 ab	31,9 ab
Glucosa	Harina de soya	4,6 b	13,5 b	8,8 b	19,9 b
Glucosa	Harina de semilla de algodón	2,1 b	4,5 c	66,0 a	115,4 a
Glucosa	Extracto de levadura	0 d	24,5 b	10,5 b	20,8 b
Glucosa	Licor de maíz fermentado	0 d	14,6 b	0,21 c	0,41 c
Melaza	Hidrolizado ácido de caseína	19,4 a	24,4 b	0 d	0 d

Fuente de Carbono	Fuente de Nitrógeno	Biomasa (mg mL ⁻¹)	
		Día 2	Día 4
Glucosa	Hidrolizado ácido de caseína	11,2 c	15,3 b
Glucosa	Harina de soya	15,5 b	19,8 a
Glucosa	Harina de semilla de algodón	15,5 b	19,9 a
Glucosa	Extracto de levadura	12,4 c	15,1 b
Glucosa	Licor de maíz fermentado	11,2 c	14,6 b
Melaza	Hidrolizado ácido de caseína	19,5 a	21,8 a

[†] Las medias seguidos por diferentes letras dentro de una columna son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$). Los datos se combinaron a partir de experimentos realizados con diferentes velocidades de agitación, ya que no hubo diferencia significativa entre 300 y 350 rpm.

La composición de los medios tuvo un efecto significativo sobre la formación y la melanización de los microesclerocios de *T. harzianum* particularmente cuando se usaron diferentes fuentes de nitrógeno. Por ejemplo, los microesclerocios producidos con harina de semilla de algodón (Pharmamedia®) estaban altamente melanizados como lo indicaba su coloración más oscura; mientras que los microesclerocios producidos con hidrolizado ácido de caseína eran de color más claro y menos compactos después de 4 días de crecimiento. Además, los microesclerocios se formaron al día 4 ya que estos propágulos se volvieron más distintos, melanizados y compactos, especialmente cuando se cultivaron con harina de semilla de algodón. No se formaron microesclerocios en el medio modificado con melaza + hidrolizado ácido de caseína, y se redujeron los números de microesclerocios en medios que contenían glucosa + líquido de maíz fermentado (≤ 400 microesclerocios mL⁻¹).

Para los conidios sumergidos, la producción fue significativamente influenciada por la interacción entre la composición de los medios y el tiempo de fermentación ($\chi^2_{(5)} = 406,3$, $P < 0,0001$). La producción de conidios sumergidos aumentó con el tiempo en todos los medios ensayados ($\chi^2_{(6)} = 453,21$, $P < 0,0001$) distintos del medio con melaza + hidrolizado

ácido de caseína. Los cultivos crecidos en medios con glucosa + harina de semilla de algodón produjeron los rendimientos conidios sumergidos más altos en 4 días de fermentación ($\chi^2_{(10)} = 472,6$, $P < 0,0001$). La composición de los medios y el tiempo de fermentación actuaron independientemente y no tuvieron un efecto sobre la acumulación de la biomasa ($\chi^2_{(5)} = 7,92$, $P = 0,161$). Los cultivos crecidos en medios que contienen melaza + hidrolizado ácido de caseína produjeron más biomasa fúngica ($\chi^2_{(10)} = 98,24$, $P < 0,0001$), que los cultivos crecidos en medios modificados con glucosa + extracto de levadura, glucosa + hidrolizado ácido de caseína o glucosa + licor de maíz fermentado (Tabla 4).

Al utilizar harina de semilla de algodón como fuente de nitrógeno y un inóculo de precultivo, la producción de microesclerocios se afectó significativamente tanto por la relación C:N ($\chi^2_{(2)} = 6,5$, $P = 0,039$) como por el tiempo de fermentación ($\chi^2_{(2)} = 16,51$, $P = 0,0003$), pero no por su interacción ($\chi^2_{(1)} = 2,05$, $P = 0,152$) indicando que las tasas de crecimiento fueron similares. Se produjeron más microesclerocios al día 2 en cultivos cultivados en un medio con una relación C:N de 10:1 en comparación con medios con una relación C:N de 30:1, mientras que en el día 3 las concentraciones de microesclerocios se redujeron en ambos medios sin diferencia estadística (Tabla 5). *Trichoderma harzianum* creció más rápido produciendo más biomasa en los medios con más nitrógeno y una relación C:N de 10:1. Hubo un efecto significativo tanto de la relación C:N ($\chi^2_{(2)} = 66,25$, $P < 0,0001$) como del tiempo de fermentación ($\chi^2_{(2)} = 26,34$, $P < 0,0001$) y su interacción ($\chi^2_{(2)} = 10,8$, $P = 0,001$) sobre la acumulación de biomasa, lo que indica que el desarrollo de la biomasa entre los medios asumió diferentes tasas. En concordancia con estos datos, los gránulos de los microesclerocios secos de cultivos cultivados en medios con una relación C:N de 10:1 produjeron 25% más conidios en comparación con gránulos de microesclerocios de cultivos crecidos en medios con una relación C:N de 30:1 ($\chi^2_{(1)} = 17,95$, $P < 0,0001$) cuando se rehidratan y se incuban en agar de agua. No obstante, los gránulos de microesclerocios de ambos medios eran tolerantes a la desecación mostrando 100% de germinación hifal después de 24 h de incubación. El estudio de estabilidad en almacenamiento reveló que la producción de conidios por gránulos de microesclerocios fue generalmente más alta en el medio con mayor contenido de nitrógeno (relación de C:N de 10:1) ($\chi^2_{(10)} = 47,14$, $P < 0,0001$) y variable con respecto a la temperatura ($\chi^2_{(10)} = 32,93$, $P = 0,0003$) y mes de almacenamiento ($\chi^2_{(16)} = 46,63$, $P < 0,0001$) (**Fig. 3**). Hubo una disminución general en la producción de conidios a lo largo del tiempo para los gránulos

de microesclerocios obtenidos de una relación C:N de 10:1 almacenados a 25 °C, mientras que la producción de conidios aumentó para los microesclerocios obtenidos de una relación C:N de 30:1 almacenados a esta misma temperatura ($\chi^2_{(8)} = 25,16$, $P = 0,0015$).

Tabla 5 – Evaluación de la relación C:N en microesclerocios y producción de biomasa por cultivos de *Trichoderma harzianum* T-22 cultivados en medio líquido con 36 g de carbono L⁻¹ y harina de semilla de algodón como fuente de nitrógeno.

Relación C:N	Microesclerocios (×10 ³ MS mL ⁻¹)		Biomasa (mg mL ⁻¹)		Producción de conidios aéreos
	Día 2	Día 4	Día 2	Día 4	
10:1	5,9 a	3,6 a	27,8 a	28,6 a	1,7 × 10 ¹⁰ a
30:1	4,4 b	3,3 a	16,3 b	19,0 b	1,3 × 10 ¹⁰ b

^aProducción de conidios en agar de agua a partir de gránulos de MS rehidratados después de 7 días de incubación a 25 °C. [†]Las medias dentro de una columna que no están seguidas por la misma letra son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

EJEMPLO 3: Producción en cultivo líquido de microesclerocios de una pluralidad de *Trichoderma* spp.

Se ensayó una pluralidad de *Trichoderma* spp. en la producción de cultivo líquido de microesclerocios y biomasa en condiciones de matraz en agitación como se describe en el Ejemplo 1. Estos cultivos de *Trichoderma* se cultivaron en el medio de cultivo líquido 6 (Tabla 1) usando harina de semilla de algodón en lugar de hidrolizado ácido de caseína como fuente de nitrógeno. Tal como se describe en la Tabla 6, una pluralidad de especies de *Trichoderma* fue capaces de formar microesclerocios bajo las condiciones indicadas. Después de 7 días de crecimiento, los microesclerocios se recogieron del caldo de cultivo añadiendo tierra de diatomeas (DE) al 5% p/v y filtrando a vacío para eliminar el medio de cultivo agotado. La torta de filtración de microesclerocios–DE se desmoronó en una licuadora y se secó al aire toda la noche a menos de un 5% de humedad.

TABLA 6- Producción de microesclerocios líquidos por varias especies de *Trichoderma* utilizando un medio de sales basales suplementado con glucosa y harina de semilla de algodón. Los cultivos crecieron durante 7 días a 350 rpm y 28 °C en una incubadora agitadora rotatoria.

Especies del género	Numero de acceso del cultivo*	Microesclerocios (L ⁻¹)	Biomasa (g L ⁻¹)
<i>Trichoderma harzianum</i>	NRRL 13879	2,0 x 10 ⁶	29,4
<i>T. harzianum</i>	NRRL 13019	2,0 x 10 ⁷	21,5
<i>T. harzianum</i>	NRRL 54962	1,9 x 10 ⁶	22,4
<i>T. harzianum</i>	ATCC 20847 (T-22)	1,2 x 10 ⁷	19,9
<i>T. lignorum</i>	NRRL 1762	5,3 x 10 ⁶	25,9
<i>T. viridae</i>	NRRL 66084	1,1 x 10 ⁶	18,8
<i>T. reesei</i>	NRRL 6156	9,7 x 10 ⁵	25,9
<i>T. koningii</i>	NRRL 66085	1,0 x 10 ⁶	26,8
<i>T. pseudokoningii</i>	NRRL 22083	1,0 x 10 ⁶	14,2
<i>T. polysporum</i>	NRRL 28981	2,4 x 10 ⁶	14,4
<i>T. hamatum</i>	NRRL 22973	8,6 x 10 ⁶	32,1
<i>T. asperellum</i>	ATCC 204424	1,0 x 10 ⁶	30,6

* NRRL - Culture Collection - USDA, Agricultural Research Service, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL, 61604. ATCC – American Type Culture Collection, Manassas, VA, 20110

EJEMPLO 4: Producción de Conidios por gránulos de microesclerocios secos

Para determinar la producción de conidios por gránulos de microesclerocios secados al aire de varias especies de *Trichoderma*, se adoptaron métodos de Jackson MA, Jaronski ST, 2009. La producción de microesclerocios del entomopatógeno fúngico *Metarhizium anisopliae* y su potencial para uso como agente de biocontrol para insectos que habitan en el suelo. *Mycological Research* 113: 842–850. En resumen, se inocularon 25 mg de preparaciones secas de microesclerocios de *Trichoderma*–DE en placas de agar de agua (2% p/v) y se incubaron a 25 °C. Tras la rehidratación, los gránulos de microesclerocios germinaron miceliogénicamente (formación de tubo germinal) y esporogénicamente (producción de conidios). Se utilizaron dos placas de agar de agua (submuestras) para cada réplica del tratamiento. Después de una incubación de 24 h a 25 °C, se examinaron cien gránulos de microesclerocios–DE por placa con un estéreo microscopio (Olympus, modelo SZH10) para la germinación hifal como medida de la viabilidad. Para enumerar la producción de conidios, las placas de agar de agua se mantuvieron a 25 °C durante un total de siete días. A continuación, cada placa se humedeció con 7 ml de solución de Tween 80 al 0,04% y los conidios se desalojaron de los gránulos de microesclerocios–DE usando una asa estéril. Después de desalojar los conidios, se pipeteó el líquido disponible de cada placa y se midió el volumen de líquido. La concentración de conidios en el líquido pipeteado se midió microscópicamente usando un hemocitómetro y se calculó el número total de conidios por placa. Para determinar el número de conidios de *Trichoderma* producido por gramo de preparación de microesclerocios–DE secados al aire, se dividió el número de conidios cosechados por placa por el peso de la preparación seca de microesclerocios–DE añadida a cada placa de agar de agua (0,025 g).

Tabla 7. Producción de conidios por gránulos de microesclerocios secos (MS) de varias especies de *Trichoderma* formuladas con tierra de diatomeas al 5% después del secado al aire. La producción de conidios se evaluó después de que los gránulos de MS se incubaron en agar de agua durante 7 días a 25 °C.

Especies del género	Numero de acceso del cultivo*	Producción de conidios (g ⁻¹ de formulación seca)
<i>Trichoderma harzianum</i>	NRRL 13879	1,5 x 10 ¹⁰ ± 0,07
<i>T. harzianum</i>	NRRL 13019	1,5 x 10 ¹⁰ ± 0,14
<i>T. harzianum</i>	NRRL 54962	1,1 x 10 ¹⁰ ± 0,05
<i>T. harzianum</i>	ATCC 20847 (T-22)	9,2 x 10 ¹⁰ ± 0,14
<i>T. lignorum</i>	NRRL 1762	2,2 x 10 ¹⁰ ± 0,14
<i>T. viridae</i>	NRRL 66084	3,0 x 10 ¹⁰ ± 0,14
<i>T. reesei</i>	NRRL 6156	2,5 x 10 ⁹ ± 0,19
<i>T. koningii</i>	NRRL 66085	6,5 x 10 ⁹ ± 0,44
<i>T. pseudokoningii</i>	NRRL 22083	4,6 x 10 ⁹ ± 0,96
<i>T. polysporum</i>	NRRL 28981	1,1 x 10 ⁹ ± 0,68
<i>T. hamatum</i>	NRRL 22973	3,9 x 10 ⁹ ± 1,01
<i>T. asperellum</i>	ATCC 204424	6,5 x 10 ⁹ ± 1,68

* NRRL- Culture Collection, USDA, Agricultural Research Service, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL, 61604 ATCC – American Type Culture Collection, Manassas, VA, 20110

5 EJEMPLO 5: Ensayo biológico del efecto de microesclerocios sobre la enfermedad de amortiguación

Se realizaron bioensayos con melón Cantaloupe (cv. 'Hales Best') para evaluar la bioeficacia de los microesclerocios de *T. harzianum* (T-22) producidos en cultivo líquido (36 g C, relación C:N de 30: 1 cosechados el día 4 y formulados con tierra de diatomeas al 5% [Hyflo®]). El patógeno de marchitamiento, *Rhizoctonia solani* NRRL 22805 (Agricultural Research Service (NRRL), Culture Collection) se cultivó en placas de Petri con agar CV8 durante tres días a 25 °C. En un matraz Erlenmeyer de 100 mL, se combinaron 25 cm³ (~8,5 g) de cascarilla de arroz pulverizada lavada y seca (partículas de ~1 mm³) con 6 mL de caldo de soja tríptico al 10% (Difco Laboratories, Detroit, MI) y 12 ml de agua doblemente desionizada. Los frascos se sometieron a autoclave durante 30 minutos en tres días consecutivos. Después se inoculo la cascarilla de arroz estéril con diez tapones de agar de 1 mm² colonizados con *R. solani*, se incubaron a 25 °C y se agitaron diariamente durante ocho días para asegurar la colonización homogénea de las partículas individuales. Un día antes de la experimentación, una pequeña muestra de la cascarilla de arroz infestada se colocó sobre un medio CV8 para asegurar la pureza del cultivo. Los tratamientos experimentales del bioensayo consistieron en *R. solani* solo (1,5 y 0,625 g de cascarilla de arroz infestada/1000 cm³ de mezcla para maceta Terra-lite RediEarth® no vaporizada (W.R. Grace, Cambridge, MA), *R. solani* (ambas dosis de inóculo) + *T. harzianum* (0,4 g de microesclerocios secados al aire/1000 cm³ de mezcla para maceta), *T. harzianum* solo y un control no inoculado. Estos tratamientos se homogeneizaron en bolsas plásticas y se agitaron vigorosamente antes de la siembra. Los experimentos se realizaron en recipientes (18 × 13 × 5,5 cm) que contenían seis celdas, y cada tratamiento tenía dos réplicas (recipientes). En cada celda (5,5 × 5 × 5,5 cm), se colocó un pequeño cuadrado de papel (Wypall®, Kimberly-Clark Professional, EE.UU.) en la parte inferior para evitar que la mezcla

para maceta se escapara de los recipientes. Se añadió un cuarto de taza (59,15 cm³) de medio para maceta no estéril, no inoculado, al fondo de cada celda. Cuarenta y cuatro cm³ de los tratamientos simples o mixtos (infestados con *R. solani* y/o tratados con *T. harzianum*) se colocaron a continuación en capas sobre la mezcla para maceta no inoculada. Se sembraron entonces tres semillas de melón dentro de la capa de mezcla de tratamiento a una profundidad de 0,5 cm y luego se colocaron en una cámara de crecimiento a 26 °C y 14 h de fase de luz. Los recipientes se regaron con agua a tope los primeros dos días después de la siembra y luego se mantuvieron en bandejas de plástico separadas con agua adecuada para mantener la humedad de la mezcla para macetas. Se realizaron evaluaciones diarias para enumerar la proporción de plántulas emergidas y de plántulas muertas que mostraban síntomas de marchitamiento causado por *R. solani* hasta el día 15 después de la siembra. El experimento se repitió tres veces en días diferentes considerando al tiempo como un efecto de bloque. A partir de aquellas plántulas que mostraban síntomas de marchitamiento, se cortaron muestras de tejido necrótico inmediatamente por encima del sistema radicular (es decir, vástago hipocótilar) y se esterilizaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (0,35% v/v) y se enjuagaron tres veces con agua estéril doblemente desionizada. Las muestras se colocaron luego en el agar de rosa-bengala de Martin (MRB) (Martin, 1950) para confirmar la asociación de *R. solani* con las plántulas marchitas. Para determinar si *T. harzianum* fue capaz de colonizar el sistema radicular del melón, las muestras de raíces de plántulas cultivadas en mezcla para maceta tratada sólo con este hongo fueron esterilizadas superficialmente, como se mencionó anteriormente, y luego se colocaron sobre el agar MRB.

El tratamiento de la mezcla para macetas con *R. solani* redujo el porcentaje de semillas de melón que emergieron y también resultó en una emergencia retardada en comparación con el control negativo o con las semillas tratadas sólo con *T. harzianum* ($\chi^2_{(5)} = 44,37$, $P < 0,0001$). La mayor tasa de inoculación de *R. solani* alteró la germinación de las semillas en mayor medida en comparación con los otros tratamientos. Por el contrario, el porcentaje de aparición de plántulas de melón aumentó significativamente en presencia del antagonista para el nivel más alto de inóculo de *R. solani* y aumentó aritméticamente, aunque no significativamente, para el tratamiento con el nivel más bajo de inóculo de *R. solani* (Tabla 8). La reducción de la enfermedad para los tratamientos que combinaron *R. solani* y *T. harzianum* se calculó sobre la base de los niveles de enfermedad obtenidos cuando las semillas se cultivaron en una mezcla para macetas infestada con la misma tasa

de inóculo patógeno solo. Así, la presencia de microesclerocios de *T. harzianum* aumentó sustancialmente la proporción de plántulas sanas al día 15 ($\chi^2_{(5)} = 54,09$, $P < 0,0001$). La progresión del marchitamiento con el tiempo fue más pronunciada en ambos tratamientos con sólo *R. solani* (prueba log-rank: $\chi^2_{(5)} = 194,7$, $P < 0,0001$) (**Fig. 4**). Por el contrario, el antagonista redujo el nivel de marchitamiento post-emergencia en 90 y 100%, respectivamente, en comparación con el suelo inoculado con el nivel alto y bajo de *R. solani* solamente. Curiosamente, la adición de gránulos de microesclerocios de *T. harzianum* a cualquier nivel de inóculo de *R. solani* aumentó significativamente la probabilidad de supervivencia de las plántulas de melón al marchitamiento en comparación con los tratamientos respectivos sin el antagonista. Se confirmó que las plántulas con síntomas de marchitamiento estaban infectadas con *R. solani* como lo reveló la morfología de crecimiento fúngico característica a partir de la superficie los tejidos hipocótilares colocados en agar MRB (**Fig. 5**). Por el contrario, las muestras de suelo y la superficie de la raíz esterilizada y los fragmentos de tallos de la mezcla para maceta tratada con *T. harzianum* mostraron el crecimiento de *T. harzianum* cuando se colocaron en MRB, lo que indica que este hongo de biocontrol mantuvo altas poblaciones en la mezcla para maceta inoculada y se asocia estrechamente con los tejidos de las raíces de las plantas (**Fig. 5**).

Tabla 8 - Porcentaje de semillas de Cantaloupe que emergieron y porcentaje que se convirtió en plántulas saludables en los bioensayos de crecimiento en cámara después del tratamiento con *Trichoderma harzianum* T-22 (0,4 g gránulos formulados/1000 cm³) para controlar *R. solani* inoculado a dos tasas (0,563 y 1,5 g/1000 cm³) en medio para maceta no estéril 15 días después de la siembra.

Tratamiento del suelo	Emergencia total (%) ^a	Plántulas saludables (%) ^c
Control (no patógeno)	84,3 a [†]	84,3 a
Control – <i>T. harzianum</i>	84,3 a	84,3 a
<i>R. solani</i> 0,625 g/L	61,1 b	33,3 c
<i>R. solani</i> 1,5 g/L	11,1 c	2,8 d
<i>R. solani</i> 0,625 g/L + <i>T. harzianum</i>	75,9 ab	75,9 ab
<i>R. solani</i> 1,5 g/L + <i>T. harzianum</i>	63,9 b	58,3 b

^a Porcentaje de emergencia de plántulas de 18 semillas sembradas por recipiente promediado para tres experimentos independientes. ^c Porcentaje de 18 semillas que se desarrollaron en plántulas saludables promediado para de tres experimentos independientes. [†] Las medias dentro de una columna que no están seguidas por la misma letra son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

EJEMPLO 5. Producción en duelo de microesclerocios de *Trichoderma harzianum* T-22 y conidios sumergidos mediante Biorreactor

Utilizando *Trichoderma harzianum* T-22 como se ha descrito anteriormente, se evaluó la producción de microesclerocios, conidios y biomasa en un fermentador B. Braun de 5 L, en volumen de 4 L. Utilizando un medio basal de sales suplementado con glucosa

y harina de algodón para producir una relación C:N de 30:1 y que contenía 36 g de carbono L⁻¹. Los cultivos de *Trichoderma harzianum* T-22 se cultivaron durante 4 días a 28 °C. El reactor se configuró a una velocidad de impulsor de 900 rpm que permitía 1,5 L de aire por minuto, de manera que el flujo de aire mantenía niveles de oxígeno disueltos cercanos o por encima de cero y proporcionaba al menos 0,1 V_{aire}/V_{medio de cultivo}. Sorprendentemente, después de cuatro días de cultivo, la aireación del biorreactor permitió obtener mejores rendimientos de microesclerocios y mejores rendimientos de conidios sumergidos, como se describe en la Tabla 9. Adicionalmente, como se describe en la Tabla 10, las formulaciones secas de microesclerocio-tierra de diatomeas del biorreactor de 5 L produjeron 5,3 × 10⁹ conidios por gramo cuando se rehidrataron e incubaron en agar de agua. Además, el 97% de los conidios sumergidos formados en esta fermentación líquida eran viables después del secado al aire a menos del 5% de humedad.

Tabla 9

Método de fermentación	Microesclerocios (× 10 ⁶ L ⁻¹)	Biomasa (g L ⁻¹)	Conidios sumergidos (× 10 ¹² L ⁻¹)
Matraz oscilante	3,3	19,0	0,0
Biorreactor	10,8	29,9	1,9

Tabla 10

Propágulo fúngico producido en el biorreactor	Microesclerocios (× 10 ⁶ L ⁻¹)	Biomasa (g L ⁻¹)
Microesclerocios	5,3 × 10 ⁹	ND
Conidios sumergidos	ND	96% - 93%

En la medida en que el término "incluye" o "incluyendo" se emplea en la descripción detallada o en las reivindicaciones, se pretende que sea inclusivo de una manera similar al término "comprendiendo" tal como se interpreta ese término cuando se emplea como una palabra de transición en una reivindicación. Además, en la medida en que el término "o" se emplea en la descripción detallada o en las reivindicaciones (por ejemplo, A o B) se pretende que signifique "A o B o ambos". Cuando los solicitantes pretenden indicar "sólo A o B, pero no ambos", entonces se empleará el término "sólo A o B, pero no ambos". Por lo tanto, el uso del término "o" en este documento es el uso inclusivo, y no exclusivo. Ver, Bryan A. Gamer, Dictionary of Modern Legal Usage 624 (2d. Ed. 1995). También, en la medida en que los términos "en" o "dentro" se usan en la memoria descriptiva o en las reivindicaciones, se pretende que signifiquen adicionalmente "en" o "sobre". Además, en la medida en que el término "conectar" se usa en la memoria descriptiva o en las

reivindicaciones, se pretende significar no sólo "directamente conectados a", sino también "indirectamente conectados a" tal como conectados a través de otro componente o componentes.

5 Aunque la invención se ha descrito con referencia a los detalles de la modalidad ilustrada, estos detalles no pretenden limitar el alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas. Todas las referencias citadas y las solicitudes de patente publicadas, citadas en esta solicitud se incorporan aquí como referencia. La modalidad de la invención sobre la que se reivindica propiedad exclusiva se encuentra definida como

10 sigue: