

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 178**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A01G 13/00 (2006.01)

A01M 1/00 (2006.01)

A01N 47/44 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

C07K 7/02 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05768866 .5**

96 Fecha de presentación: **08.08.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1788074**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2007**

54 Título: **Nuevas cepas que pertenecen al género paenibacillus y método para controlar una enfermedad vegetal mediante el uso de estas cepas o de sus cultivos**

30 Prioridad:
09.08.2004 JP 2004231858

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.04.2012

73 Titular/es:
**KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.
28-8, HONKOMAGOME 2-CHOME
BUNKYO-KU, TOKYO 113-8650, JP**

72 Inventor/es:
**KOCHI, Shinichiro;
FUJIMAKI, Tsukasa;
KANAI, Yoshinori;
FUTAMATA, Katsuyuki;
KIOKA, Yuzo y
NOGUCHI, Katsunori**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 379 178 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevas cepas que pertenecen al género *paenibacillus* y método para controlar una enfermedad vegetal mediante el uso de estas cepas o de sus cultivos

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto seleccionado de los compuestos 1, 2, 3 y 4 (definidos más abajo) para inducir resistencia a enfermedades en una planta. La presente invención también se refiere a cepas nuevas que pertenecen al género *Paenibacillus* y al control de enfermedades vegetales utilizando estas cepas o cultivos de las mismas. Más particularmente, la presente invención se refiere a cepas que pertenecen al género *Paenibacillus* que son capaces de controlar enfermedades vegetales al mostrar una actividad inductora de
- 10 resistencia a enfermedades en las plantas mediante la producción de una sustancia, a saber, al menos uno de los compuestos 1, 2, 3 y 4, capaz de inducir resistencia a enfermedades en las plantas, y más específicamente, se refiere a cepas nuevas que pertenecen al género *Paenibacillus*, tal como *Paenibacillus sp.* BS-0048, *Paenibacillus sp.* BS-0074, *Paenibacillus polymyxa* BS-0105, *Paenibacillus sp.* BS-0277, etc.; el control de enfermedades vegetales mediante estas cepas que pertenecen al género *Paenibacillus*; y el control de enfermedades vegetales
- 15 mediante la nueva actividad que los compuestos obtenidos de cultivos de estas cepas que pertenecen al género *Paenibacillus* tienen para inducir resistencia a enfermedades en las plantas.

Antecedentes de la técnica

- En el campo de la agricultura, la aparición de alguna enfermedad vegetal ocasiona una notable disminución del rendimiento de los cultivos y, por lo tanto, el control de las enfermedades vegetales es un medio indispensable para
- 20 las técnicas de la agricultura. Como medio de controlar las enfermedades, está, por ejemplo, el control del ambiente para el cultivo, el crecimiento de un cultivar resistente a enfermedades, el control de las enfermedades mediante la aplicación de fungicidas o bactericidas agrícolas y hortícolas, y el control biológico de las enfermedades mediante el uso de materiales orgánicos o similares. De ellos, el control utilizando fungicidas o bactericidas agrícolas y hortícolas es directo y es el más eficaz. Sin embargo, depender demasiado de un medio que comprende el control directo de
- 25 las enfermedades mediante la aplicación de una gran cantidad de fungicidas o bactericidas es claramente indeseable debido a problemas tales como la contaminación ambiental y la alteración de los seres vivos del entorno.

- En tal situación, se han desarrollado fungicidas y bactericidas agrícolas y hortícolas que son específicamente eficaces contra los hongos y bacterias patógenos, respectivamente, y tienen una acción fungicida o bactericida extraordinaria desde el punto de vista de la toxicidad selectiva. Sin embargo, tales sustancias químicas son
- 30 desventajosas porque tienden a acarrear tolerancia química en los hongos o bacterias patógenos. Como remedio para este problema se aplican numerosas sustancias químicas de acción diferente en forma de mezcla de las mismas o en rotación.

- Para solventar el problema de la dependencia excesiva en tales productos agroquímicos se han puesto en práctica en los últimos años métodos para controlar enfermedades vegetales o plagas de insectos de distintos cultivos
- 35 mediante el uso de microorganismos o enemigos naturales, que generalmente se encuentran presentes en el entorno natural, y se tiene que mejorar un sistema de control. Por ejemplo, el documento 1 de patente ha propuesto que se deben utilizar las células de un microorganismo tal como *Bacillus subtilis* FR-2, *Bacillus polymyxa* KT-8 o similares a modo de controlador de la infección por hongos vegetales. No bastan todavía ni la eficacia ni la clase de tal controlador, y se requiere un controlador biológico mejor.

- 40 Para solventar el problema de la aparición de hongos y bacterias resistentes a los productos químicos, se considera que lo más eficaz es utilizar una sustancia o un microorganismo que sea capaz de inducir resistencia a enfermedades en las plantas.

- Aunque hasta la fecha se conozca un número determinado de sustancias capaces de inducir resistencia a enfermedades en la planta, tal como el ácido salicílico, sólo algunas de ellas, tales como S-metil-1,2,3-benzotiazol-7-
- 45 carboxilato (nombre común: acibenzolar-S-metil) (documento 1 que no es patente y documento 2 que no es patente) y 3-(2-propileneoxi)-1,2-bencisotiazol-1,1-dióxido (nombre común: probenazol) (documento 3 que no es patente) se utilizan realmente como productos químicos para controlar las enfermedades vegetales. Así pues, tales sustancias no son satisfactorias.

- El documento 2 de patente describe la acción de conferir resistencia a enfermedades vegetales mediante el uso de
- 50 bacterias capaces de inducir resistencia a enfermedades en las plantas y un acondicionador de suelo orgánico. Sin embargo, este método no es satisfactorio.

- Por otra parte, el documento 3 de patente ha descrito que una sustancia activa antimicrobiana KT-6291A (fusaricidina A) producida por *Bacillus sp.* KB-291 controla diversas enfermedades vegetales. Si embargo, se ha
- 55 puesto de manifiesto que la sustancia activa antimicrobiana KT-6291A descrita en el documento 3 de patente es inactiva no sólo contra el marchitamiento bacteriano del pepino, debido a una bacteria gramnegativa, sino también contra otras bacterias gramnegativas. El documento 3 de patente no describe un método para controlar las enfermedades vegetales causadas por las bacterias gramnegativas. Además, se ha revelado que la sustancia KT-

6291A no tiene actividad antimicrobiana contra hongo del marchitamiento por *Fusarium del pepino*, una cepa que pertenece al género *Fusarium*. El documento 3 de patente describe otras sustancias que tienen actividad antimicrobiana contra varios microorganismos, pero no ofrece ninguna información respecto a una actividad inductora de resistencia a enfermedades en las plantas.

- 5 De igual forma, el documento 4 que no es patente revela que una sustancia activa antimicrobiana, la fusaricidina A, se produce en *Bacillus polymxa* KT-8, pero que esta sustancia es inactiva contra las bacterias gramnegativas.

Además, el documento 5 que no es patente revela que la fusaricidina B y similares las produce, junto a la fusaricidina A, *Bacillus polymxa* KT-8, pero que estas sustancias son inactivas contra las bacterias gramnegativas.

Documento 1 de patente: patente japonesa JP-A-6-253827

- 10 Documento 2 de patente: patente japonesa JP-T-203-529539

Documento 3 de patente: patente japonesa JP-A-2-275898

Documento 1 que no es patente: *Plant Physiol.* 117, pág. 1333-1339 (1998).

Documento 2 que no es patente: *Brighton Crop Protection Conference: pest & diseases* – 1996, 8A-4, CGA2455704.

Documento 3 que no es patente: *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, pág. 439-59, (1994).

- 15 Documento 4 que no es patente: *The Journal of Antibiotics*, vol. 49, n.º 2, pág. 129-135 (1996).

Documento 5 que no es patente: *The Journal of Antibiotics*, vol. 50, n.º 3, pág. 220-228 (1997).

Descripción de la invención

- 20 La presente invención da a conocer una cepa que pertenece al género *Paenibacillus* que es capaz de mostrar una capacidad inductora de resistencia a enfermedades en la planta y da a conocer una sustancia capaz de inducir resistencia a enfermedades en las plantas, siendo dicha sustancia al menos uno de los compuestos 1 a 4.

La presente invención también da a conocer un controlador de enfermedades vegetales y un método para controlar enfermedades vegetales, que utiliza la cepa o sustancia mencionada más arriba.

Maneras de resolver los problemas

- 25 A tenor de la situación descrita más arriba, los presentes inventores investigaron con tenacidad para encontrar un método mejor que controle las enfermedades vegetales y, en consecuencia, encontraron que algunas bacterias, que pertenecen al género *Bacillus* cuando se identificaron mediante un ensayo fisiocaracterológico y morfológico de las cepas, y que pertenecen al género *Paenibacillus* cuando se identificaron mediante el análisis de la secuencia nucleotídica del ADNr 16S, tienen un excelente efecto controlador de las enfermedades vegetales. Además, quedó claro que los compuestos que tienen una actividad que induce resistencia a enfermedades en la planta están
- 30 presentes en los cultivos de algunas de las bacterias mencionadas más arriba que pertenecen al género *Bacillus* o *Paenibacillus*. Sobre la base de estos hallazgos se ha llevado a término la presente invención.

Así pues, la presente invención se refiere a cepas nuevas que pertenecen al género *Paenibacillus* que tienen un efecto controlador sobre las enfermedades vegetales.

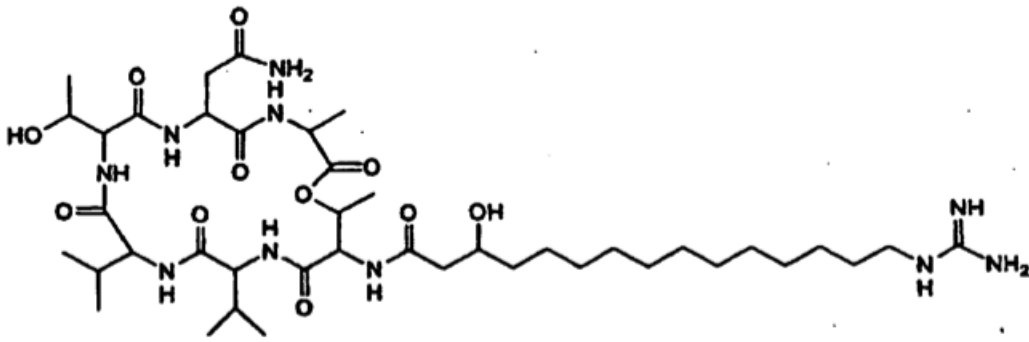
- 35 Además, la presente invención se refiere a cepas que pertenecen al género *Paenibacillus* que pueden mostrar un efecto controlador de las enfermedades vegetales al mostrar una actividad capaz de inducir resistencia a enfermedades en las plantas mediante la producción de una sustancia capaz de inducir resistencia a enfermedades en las plantas.

Además, la presente invención se refiere a una composición que contiene la cepa mencionada más arriba que pertenece al género *Paenibacillus*.

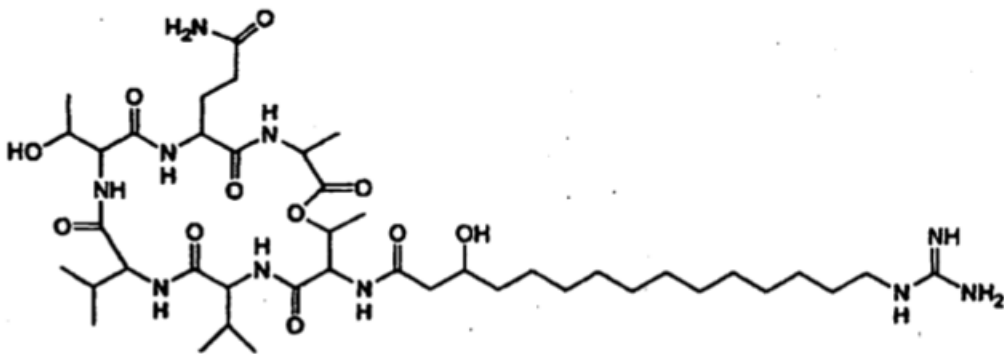
- 40 Aún más, la presente invención se refiere a una composición que contiene una o una combinación de dos o más sustancias capaces de inducir resistencia a enfermedades en la planta que se obtienen de un cultivo de la cepa mencionada más arriba que pertenece al género *Paenibacillus*.

Aún más, la presente invención se refiere a un controlador de enfermedades vegetales que comprende la composición mencionada más arriba.

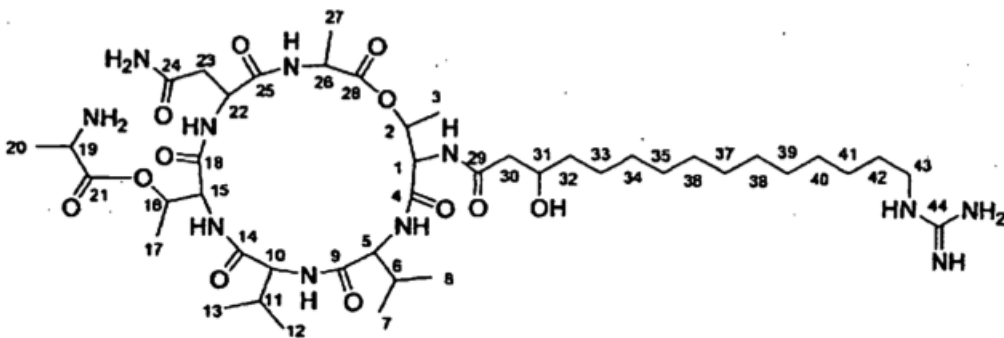
- 45 Aún más, la presente invención se refiere a un controlador de enfermedades vegetales que contiene al menos un compuesto seleccionado entre compuesto 1 (fusaricidina A), compuesto 2 (fusaricidina B), compuesto 3 y compuesto 4, que tienen las estructuras siguientes:



Compuesto 1 (fusaricidina A)

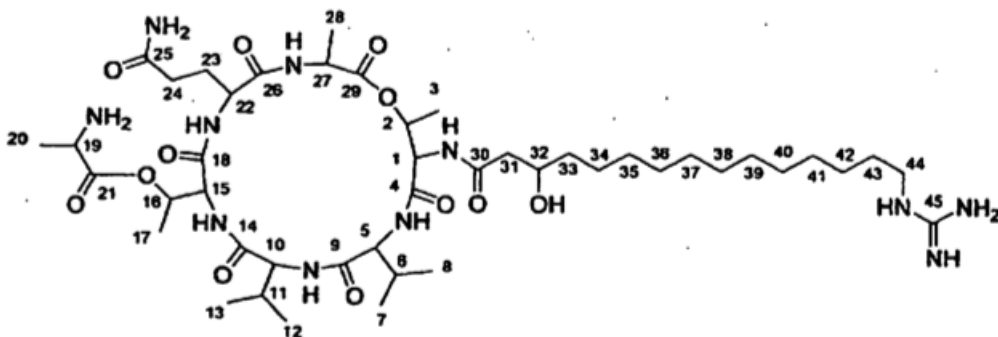


Compuesto 2 (fusaricidina B)



5

Compuesto 3



Compuesto 4

10 Aún más, la presente invención se refiere a un método para controlar enfermedades vegetales caracterizado por proteger las plantas de infecciones por fitopatógenos mediante la aplicación a las plantas de la cepa mencionada más arriba que pertenece al género *Paenibacillus*, composición o controlador de enfermedades vegetales.

Aún más, la presente invención se refiere a los compuestos 3 y 4 nuevos que tienen las fórmulas estructurales anteriores.

En la presente especificación, el término «cepa que pertenece al género *Paenibacillus*» se refiere a una cepa que pertenece al género *Bacillus* cuando se identifica mediante un ensayo fisiocaracterológico y morfológico sobre la cepa y que pertenece al género *Paenibacillus* cuando se identifica mediante el análisis de la secuencia de bases del ADNr 16S.

5 Ventajas de la invención

Las cepas que pertenecen al género *Paenibacillus* de la presente invención son capaces de controlar enfermedades vegetales ocasionadas por bacterias gramnegativas (p. ej., cepas que pertenecen al género *Pseudomonas*) y cepas que pertenecen al género *Fusarium* al mostrar una actividad inductora de resistencia a enfermedades en las plantas.

- Además, los nuevos microorganismos hallados por la presente invención, a saber, *Paenibacillus* sp. BS-0048, *Paenibacillus* sp. BS-0074, *Paenibacillus polymyxa* BS-0105 y *Paenibacillus* sp. BS-0277 son capaces de controlar las enfermedades vegetales ocasionadas por las bacterias gramnegativas y las cepas que pertenecen al género *Fusarium* y, además, son capaces de controlar las enfermedades vegetales ocasionadas por los hongos fitopatógenos habituales, por ejemplo, distintos hongos patógenos tales como las cepas que pertenecen al género *Colletotrichum* y cepas que pertenecen al género *Glomerella*. Aquí, por ejemplo, la terminología «*Paenibacillus* sp. BS-0048» significa una y la misma cepa que puede denominarse *Bacillus* sp. BS-0048 cuando se identifica mediante un ensayo fisiocaracterológico y morfológico de la cepa y puede denominarse *Paenibacillus* sp. BS-0048 cuando se identifica mediante el análisis de la secuencia de bases del ADNr 16S. La terminología «*Paenibacillus polymyxa* BS-0105» significa una y la misma cepa que puede denominarse *Bacillus* sp. BS-0105 perteneciente al género *Bacillus* cuando se identifica mediante un ensayo fisiocaracterológico y morfológico de la cepa, y puede denominarse *Paenibacillus polymyxa* BS-0105 perteneciente a la especie *polymyxa* del género *Paenibacillus* cuando se identifica mediante el análisis de la secuencia de bases del ADNr 16S.

- Además, el compuesto 1 (fusaricidina A), el compuesto 2 (fusaricidina B), el compuesto 3 y el compuesto 4, que se sintetizan en las cepas que pertenecen al género *Paenibacillus*, tienen una actividad que induce resistencia a enfermedades en la planta y, por lo tanto, tienen una capacidad para proteger las plantas frente a infecciones con fitopatógenos, de modo que son eficaces a la hora de controlar las enfermedades vegetales.

Breve descripción de los dibujos

En la figura 1 se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de protones (DMSO-d6) del compuesto 3 nuevo de la presente invención.

- En la figura 2 se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de protones (DMSO-d6) del compuesto 4 nuevo de la presente invención.

Mejor modo de realizar la invención

- Mediante la presente invención se dan a conocer cepas nuevas del género *Paenibacillus* que tienen efecto controlador de enfermedades vegetales y se dan a conocer cepas del género *Paenibacillus* que muestran efecto controlador de enfermedades vegetales al mostrar una actividad inductora de resistencia a enfermedades en las plantas mediante la producción de una sustancia capaz de inducir resistencia a enfermedades en las plantas. La sustancia capaz de inducir resistencia a enfermedades en las plantas de acuerdo con la presente invención es al menos un compuesto seleccionado entre los arriba mencionados compuesto 1 (fusaricidina A), compuesto 2 (fusaricidina B), compuesto 3 y compuesto 4.

- La terminología «actividad inductora de resistencia a enfermedades en la planta» utilizado aquí hace referencia a una actividad que confiere la denominada «resistencia inducida a enfermedades» en la planta. Las cepas que pertenecen al género *Paenibacillus* y capaces de producir una sustancia que tiene tal actividad, y las sustancias capaces de inducir resistencia a enfermedades vegetales, tales como compuesto 1 (fusaricidina A), compuesto 2 (fusaricidina B), compuesto 3 y compuesto 4, son capaces de proteger las plantas frente a las infecciones por fitopatógenos. Por lo tanto, protegen las plantas de infecciones por fitopatógenos al mostrar la actividad inductora de resistencia a enfermedades en la planta sin mostrar actividad antimicrobiana directa, por lo que son capaces de controlar las enfermedades vegetales.

Ejemplos específicos de tales cepas que pertenecen al género *Paenibacillus* son las nuevas cepas *Paenibacillus* sp. BS-0048, *Paenibacillus* sp. BS-0074, *Paenibacillus polymyxa* BS-0105 y *Paenibacillus* sp. BS-0277.

- Como cepas del género *Paenibacillus* utilizadas en la presente invención se pueden utilizar incluso cepas que se puede decir que pertenecen al género *Bacillus* cuando se identifican mediante un ensayo fisiocaracterológico y morfológico de las cepas, con tal de que pertenezcan al género *Paenibacillus* cuando se identifican mediante el análisis de la secuencia de bases del ADNr 16S.

- Las cepas que pertenecen al género *Paenibacillus* de la presente invención son capaces de controlar enfermedades vegetales ocasionadas por bacterias gramnegativas y cepas que pertenecen al género *Fusarium*, al mostrar una actividad inductora de resistencia a enfermedades en las plantas mediante la producción de una sustancia capaz de

inducir resistencia a enfermedades en las plantas, siendo la sustancia al menos un compuesto seleccionado entre los antes mencionados compuesto 1 (fusaricidina A), compuesto 2 (fusaricidina B), compuesto 3 y compuesto 4, en donde dicha sustancia también es capaz de controlar por sí misma las enfermedades vegetales ocasionadas por bacterias gramnegativas y por cepas que pertenecen al género *Fusarium*, al mostrar la actividad inductora de
5 resistencia a enfermedades en las plantas.

Al igual que las enfermedades vegetales ocasionadas por bacterias gramnegativas, se dan ejemplos de enfermedades vegetales ocasionadas por las cepas que pertenecen al género *Pseudomonas*. Ejemplos específicos de las enfermedades vegetales son el marchitamiento bacteriano de las plantas cucurbitáceas, tal como el tizón bacteriano (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) del melón y del pepino, y la putrefacción bacteriana de la vaina
10 (*Pseudomonas fuscovaginae*) del arroz. Al igual que las enfermedades ocasionadas por las cepas que pertenecen al género *Fusarium*, se dan ejemplos de fusariosis (*Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*) de cebada, trigo, avena y centeno, marchitamiento por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*, f. sp. *cucumerium*) del pepino, marchitamiento por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*) del melón, y marchitamiento por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) del tomate.

15 Las cepas que pertenecen al género *Paenibacillus* de la presente invención, tal como las cepas nuevas *Paenibacillus* sp. BS-0048, *Paenibacillus* sp. BS-0074, *Paenibacillus polymyxa* BS-0105 y *Paenibacillus* sp. BS-0277 son capaces de controlar las enfermedades vegetales de ejemplo nombradas más arriba ocasionadas por bacterias gramnegativas y por cepas que pertenecen al género *Fusarium* y, además, son capaces de controlar las enfermedades vegetales ocasionadas por los hongos fitopatógenos habituales, por ejemplo, distintos hongos
20 patógenos tales como cepas que pertenecen al género *Colletotrichum* y cepas que pertenecen al género *Glomerella*. Las enfermedades vegetales ocasionadas por las cepas que pertenecen al género *Colletotrichum* incluyen, por ejemplo, la antracnosis de plantas cucurbitáceas, tales como antracnosis (*Colletotrichum orbiculare*) del pepino, y antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) de la fresa. Las enfermedades vegetales ocasionadas por las cepas que pertenecen al género *Glomerella* incluyen, por ejemplo, pudrición amarga (*Glomerella cingulata*) de la uva madura y
25 antracnosis (*Glomerella cingulata*) de la fresa.

Las cepas que pertenecen al género *Paenibacillus* de la presente invención son eficaces también contra otras enfermedades vegetales además de las enfermedades vegetales de ejemplo nombradas más arriba, tales como moho gris (*Botrytis cinerea*) y pudrición del tallo (*Sclerotinia sclerotiorum*) de diferentes plantas de cultivo; espiga blanca (*Pyricularia oryzae*), plaga de la vaina (*Thanatephorus cucumeris*) y manchas de las hojas por
30 *Helminthosporium* (*Cochliobolus miyabeanus*) del arroz; roña (*Venturia inaequalis*), mancha de la hoja por *Alternaria* (*Alternaria mali*) y cancro (*Valsa ceratosperma*) del manzano; mancha negra (*Alternaria kikuchiana*) y roña (*Venturia nashicola*) del peral; melanosis (*Diaporthe citri*), moho azul (*Penicillium italicum*) y cancro (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) del limonero; pudrición por *Phomopsis* (*Phomopsis* sp.) y podredumbre parda o gomosis (*Monilinia fructicola*) del melocotonero; antracnosis (*Gloeosporium kaki*) y mancha foliar angular (*Cercospora kaki*) del caqui japonés; oídio (*Erysiphe graminis*), roya (*Puccinia graminis*, *P. striformis*, *P. recondita*), carbón volador (*Ustilago nuda*) y podredumbre (*Gibberella zeae*, *Monographella nivalis*) de cebada, trigo, avena y centeno; oídio pulverulento (*Sphaerotheca cucurbitae*), chancro gomoso del tallo (*Didymella bryoniae*) y mildiu (*Pseudoperonospora cubensis*) del pepino; cladosporiosis (*Fulvia fulva*) del tomate; verticilosis (*Verticillium dahliae*), tizón pardo (*Phytophthora capsici*) y podredumbre parda (*Ralstonia solanacearum*) de la berenjena; mancha parda (*Alternaria alternata*) del
40 tabaco; viruela (*Cercospora beticola*) de la remolacha; tizón tardío (*Phytophthora infestans*) de la patata; mancha púrpura (*Cercospora kikuchii*) de la soja; mildiu (*Peronospora brassicae*) del rábano japonés; mildiu (*Peronospora spinaciae*) de las espinacas; mancha foliar bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vitians*) y marchitamiento bacteriano (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) de la lechuga; putrefacción negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) de la col; hernia (*Plasmodiophora brassicae*) de las verduras crucíferas; tizón de la plántula (*Pythium* sp.) de varias plantas de cultivo; putrefacción violeta de la raíz (*Helicobasidium mompa*) de árboles frutales; gran parche (*Rhizoctonia solani*) y tizón de la hoja por *Curvularia* (*Curvularia* sp.) de hierba de pasto; etc.

Además, las cepas que pertenecen al género *Paenibacillus* de la presente invención y las sustancias capaces de inducir resistencia a enfermedades en la planta de acuerdo con la presente invención, a saber, el compuesto 1 (fusaricidina A), el compuesto 2 (fusaricidina B), el compuesto 3 y el compuesto 4 mencionados más arriba muestran
50 por sí mismos una actividad inductora de resistencia a enfermedades en la planta y, por lo tanto, protegen a las plantas de infecciones con fitopatógenos, por lo que pueden controlar las enfermedades vegetales. A modo de fitopatógenos se pueden tomar de ejemplo no sólo las diversas bacterias y hongos mencionados más arriba, sino también los virus.

En relación con los hongos, se ofrecen de ejemplo hongos capaces de ocasionar las enfermedades vegetales
55 siguientes: podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) y podredumbre blanda (*Sclerotinia sclerotiorum*) de distintas plantas de cultivo; espiga blanca (*Pyricularia oryzae*), mustia hilachosa (*Thanatephorus cucumeris*) y mancha parda o helmintosporiosis (*Cochliobolus miyabeanus*) del arroz; sarna (*Venturia inaequalis*), corazón mohoso (*Alternaria mali*) y cancro (*Valsa ceratosperma*) del manzano; mancha negra (*Alternaria kikuchiana*) y roña (*Venturia nashicola*) del peral; melanosis (*Diaporthe citri*) y moho azul (*Penicillium italicum*) del limonero; pudrición por *Phomopsis* (*Phomopsis* sp.) y podredumbre parda o moniliosis (*Monilinia fructicola*) del melocotonero; antracnosis (*Gloeosporium kaki*) y mancha foliar angular (*Cercospora kaki*) del caqui japonés; pudrición amarga (*Glomerella cingulata*) de la uva; oídio pulverulento (*Erysiphe graminis*), royas (*Puccinia graminis*, *P. striformis*, *P. recondita*),

carbón volador (*Ustilago nuda*) y tizón (*Monographella nivalis*) de la cebada, trigo, avena y centeno; oídio pulverulento (*Sphaerotheca cucurbitae*), tizón gomoso del tallo (*Didymella bryoniae*), antracnosis (*Colletotrichum orbiculare*) y oídio suave (*Pseudoperonospora cubensis*) del pepino; cladosporiosis (*Fulvia fulva*) del tomate; marchitamiento por *Verticillium* (*Verticillium dahliae*) y podredumbre parda (*Phytophthora capsici*) de la berenjena; 5 antracnosis (*Colletotrichum acutatum*, *Glomerella cingulata*) de la fresa; mancha parda (*Alternaria alternata*) del tabaco; mancha de la hoja (*Cercospora beticola*) de la remolacha; tizón tardío (*Phytophthora infestans*) de la patata; mancha morada (*Cercospora kikuchii*) de la soja; mildiu suave (*Peronospora brassicae*) del rábano japonés; mildiu suave (*Peronospora spinaciae*) de las espinacas; hernia o nudo de la raíz (*Plasmodiophora brassicae*) de las plantas crucíferas; pudrición de la plántula (*Pythium sp*) de distintas plantas de cultivo; pudrición violeta de la raíz 10 (*Helicobasidium mompa*) de los árboles frutales; podredumbre negra (*Rhizoctonia solani*) y mancha foliar (*Curvularia sp.*) de la hierba de pasto; etc.

Además de los anteriores hongos de ejemplo, al igual que las bacterias, hay ejemplos de bacterias capaces de ocasionar las enfermedades vegetales siguientes: cancro (*Xanthomonas campestris pv. citri*) del limonero; marchitamiento bacteriano (*Ralstonia solanacearum*) de la berenjena; mancha angular foliar (*Xanthomonas 15 campestris pv. vitians*) y podredumbre bacteriana (*Erwinia carotovora subsp. carotovora*) de la lechuga; y pudrición negra (*Xanthomonas campestris pv. campestris*) de la col.

A modo de virus, hay virus de ejemplo capaces de ocasionar las enfermedades vegetales siguientes: mosaico del pepino (cucumovirus del mosaico del pepino, potivirus del mosaico de la sandía, porivirus del mosaico amarillo del calabacín), enfermedades víricas del tomate (necrovirus de la necrosis del tabaco), enfermedades víricas de la fresa 20 (citorabdovirus del arrugado de la fresa, virus C latente de la fresa, luteovirus del enanismo de la soja, virus del manchado de la fresa, carlavirus de borde amarillo pseudoleve de la fresa, caulimovirus de las franjas moteadas de la fresa, tobamovirus del mosaico del tabaco, necrovirus de la necrosis del tabaco), mosaico de la col (caulimovirus del mosaico de la coliflor, cucumovirus del mosaico del pepino, porivirus del mosaico del nabo), enfermedades víricas de la soja (sobemovirus del mosaico de la judía sureña, cucumovirus del enanismo del cacahuete, porivirus 25 del mosaico común de la judía, fabavirus del marchitamiento del haba) y enrollamiento de la hoja de la patata (luteovirus del enrollamiento de la hoja de la patata).

Cuando la cepa del género *Paenibacillus* de la presente invención se utiliza para controlar las enfermedades vegetales, se suelen utilizar esporas, células vegetativas, cultivo completo o similares de la cepa del género *Paenibacillus*. Se pueden preparar de un cultivo obtenido del cultivo de la cepa del género *Paenibacillus* mediante un 30 método convencional. El cultivo completo obtenido se puede preparar en polvo de cultivo completo, por ejemplo, liofilizando el cultivo completo tal cual. Las células vegetativas se pueden preparar como un precipitado de células, por ejemplo, centrifugando el cultivo completo para retirar los contaminantes después de haberlo hecho crecer, centrifugación adicional del sobrenadante resultante y entonces lavado de las células precipitadas. Además, las esporas se pueden preparar como polvo de esporas liofilizado, por ejemplo, mediante la suspensión del precipitado 35 celular obtenido más arriba en agua destilada y la liofilización de la suspensión resultante.

Aunque la cepa del género *Paenibacillus* utilizada en la presente invención es normalmente de células viables, puede ser de células muertas por un tratamiento con calor o similar. Las células viables citadas aquí incluyen, tal y como se describió más arriba, células viables obtenidas del cultivo, células secadas obtenidas de las células viables, 40 células separadas del cultivo mediante un método convencional tal como filtración, centrifugación o similar, y células secadas después de la separación y recogida.

Las cepas que pertenecen al género *Paenibacillus*, tales como *Paenibacillus sp.* BS-0048, *Paenibacillus sp.* BS-0074, *Paenibacillus polymyxa* BS-0105, *Paenibacillus sp.* BS-0277, etc., se cultivan mediante un método de cultivo convencional para las bacterias habituales. Se pueden cultivar con cada método imaginable tal como cultivo sólido o cultivo líquido (p. ej., cultivo en agitación en tubo de ensayo, cultivo de agitación recíproco, cultivo de agitación 45 rotatorio, cultivo en fermentador o cultivo en tanque). Como medio de cultivo se puede utilizar una combinación apropiada de distintas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales orgánicas y sales inorgánicas. En general, las fuentes de carbono incluyen, por ejemplo, glucosa, almidón, glicerol, dextrina, sacarosa y aceites animales y vegetales. Las fuentes de nitrógeno orgánico incluyen, por ejemplo, extracto de levadura, harina de soja, licor de maíz fermentado, germen de trigo, extracto de carne y peptona. Las fuentes de nitrógeno inorgánico incluyen, por 50 ejemplo, nitrato de sodio, nitrato de amonio, sulfato de amonio y acetato de amonio. Las sales orgánicas y las sales inorgánicas incluyen, por ejemplo, acetatos tales como acetato de sodio, etc.; carbonatos tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, etc.; cloruros tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, etc.; fosfatos tales como dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de disodio, etc.; y sulfatos tales como sulfato ferroso, sulfato de zinc, sulfato de cobre, etc. Aunque la temperatura del cultivo se puede variar adecuadamente siempre y cuando el 55 microorganismo sea capaz de crecer, ésta está preferentemente dentro del intervalo de 20 °C a 40 °C. Normalmente, el cultivo se lleva a cabo en condiciones aerobias. Particularmente cuando se lleva a cabo en un fermentador o en un tanque de cultivo, el cultivo se lleva a cabo a la vez que se introduce aire estéril. Un método y unas condiciones para el cultivo no están particularmente limitados siempre y cuando el microorganismo sea capaz de crecer.

60 El compuesto 1 (fusaricidina A) y el compuesto 2 (fusaricidina B), que se utilizan en la presente invención como sustancia capaz de inducir resistencia a enfermedades en la planta, se pueden obtener de un cultivo de la nueva

cepa del género *Paenibacillus* (p. ej., *Paenibacillus* sp. BS-0048, *Paenibacillus* sp. BS-0074, *Paenibacillus polymyxa* BS-0105 o *Paenibacillus* sp. BS-0277) encontrada por la presente invención, o una cepa del género *Bacillus*, tal como *Bacillus* sp. KB-291 (patente japonesa JP-A-2-275898) o *Bacillus polymyxa* KT-8 (*The Journal of Antibiotics*, vol. 49, n.º 2, pág. 129-135 (1996); *The Journal of Antibiotics*, vol. 50, n.º 3, pág. 220-228 (1997)) que se sabe que producen los compuestos mencionados más arriba. El compuesto 3 y el compuesto 4 se pueden obtener de un cultivo de la cepa nueva mencionada más arriba del género *Paenibacillus* encontrada mediante la presente invención. Específicamente, tal cepa se cultiva mediante un método convencional y el compuesto mencionado más arriba se puede obtener del caldo de cultivo resultante mediante el método descrito en las referencias mencionadas más arriba o una combinación de los métodos de purificación convencionales. El compuesto mencionado más arriba se puede obtener, por ejemplo, mediante la extracción del caldo de cultivo con butanol, acetato de etilo o similares, y sometiendo la solución de extracto a cromatografía líquida de alta resolución.

Las cepas del género *Paenibacillus* o las sustancias capaces de inducir resistencia a las enfermedades vegetales, a saber, compuesto 1 (fusaricidina A), compuesto 2 (fusaricidina B), compuesto 3 y compuesto 4, que se utilizan para controlar las enfermedades vegetales en la presente invención, se pueden utilizar tal cual sin añadir ningún otro compuesto. Si es necesario, se puede utilizar una composición preparada mezclando la cepa o sustancia mencionada más arriba con alguno de los diferentes vehículos tales como vehículos sólidos o vehículos líquidos, o una formulación obtenida por la preparación de la cepa o sustancia en un polvo hidratable, un concentrado soluble, una suspensión, gránulos, un polvo, microcápsulas, una pasta o similares, mediante la adición de adyuvantes para la formulación, tales como aditivos.

Tal formulación contiene la cepa del género *Paenibacillus* de la presente invención, normalmente en una cantidad de aproximadamente el 0,1% al 99% en peso (el peso de la bacteria es peso húmedo). La formulación preferentemente contiene la cepa del género *Paenibacillus* de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^{11} unidades formadoras de colonias (de aquí en adelante se abrevia como UFC) por gramo de la formulación. Cuando se usan esporas, células vegetativas o cultivo completo de la cepa del género *Paenibacillus*, la formulación contiene preferentemente las esporas, las células vegetativas o el cultivo completo en una cantidad de aproximadamente 10^3 a 10^{11} UFC/g de la formulación, o en una cantidad que suele ser aproximadamente del 0,1% al 99% en peso (peso húmedo). En el caso de las sustancias capaces de inducir resistencia a enfermedades en la planta, la formulación preferentemente contiene al menos un compuesto seleccionado entre compuesto 1 (fusaricidina A), compuesto 2 (fusaricidina B), compuesto 3 y compuesto 4 en una cantidad del 0,01% al 99%.

Los vehículos sólidos utilizados en la formulación incluyen, por ejemplo, polvos minerales (p. ej., arcilla de caolín, bentonita, tierra de diatomeas, óxido de sílice hidratado sintético, talco, cuarzo, vermiculita y perlita), sales inorgánicas (p. ej., sulfato de amonio, fosfato de amonio, nitrato de amonio, urea y cloruro de amonio), polvos orgánicos (harina de trigo, harina de soja, salvado de trigo, quitina, salvado de arroz, leche en polvo desnatada y leche en polvo entera), carbón activo y carbonato de calcio. Los vehículos líquidos incluyen, por ejemplo, agua, glicerol, aceites vegetales (p. ej., aceite de soja y aceite de colza), aceites animales líquidos (p. ej., aceite de pescado), etilenglicol, poli(etilenglicol)es, propilenglicol y poli(propilenglicol)es.

Los adyuvantes para formulación incluyen, por ejemplo, anticongelantes tales como caseína, gelatina, polisacáridos (p. ej., polvo de almidón, goma arábiga, derivados de celulosa y ácido alginico), derivados de lignina, bentonita, azúcares, aceites vegetales, aceites minerales, polímeros hidrosolubles sintéticos (p. ej., poli(alcohol vinílico)s, poli(ácido acrílico)s, propilenglicol, etilenglicol, etc.; desespumantes tales como compuestos del tipo silicona; y espesantes tales como polisacáridos naturales (p. ej., goma de xantano), sustancias inorgánicas (p. ej., aluminio y bentonita), polímeros hidrosolubles sintéticos (p. ej., poli(ácido acrílico)s).

La formulación se puede utilizar en una mezcla con insecticidas, nematocidas, acaricidas, fungicidas, bactericidas, herbicidas, reguladores del crecimiento de la planta, diseminadores, fertilizantes, materiales microbianos, acondicionador de suelo y similares, o se pueden utilizar juntos, pero sin mezclarlos.

En el control de enfermedades vegetales de acuerdo con la presente invención, la dosis de aplicación (dosis húmeda) del ingrediente activo de la cepa del género *Paenibacillus* utilizada es normalmente de 0,1 g a unos 10 000 g, preferentemente de unos 10 g a unos 1000 g, por cada 10 áreas. Cuando el polvo hidratable, suspensión, microcápsulas o similar se utiliza después de haberse diluido con agua, la concentración de células en el momento de la aplicación suele ser de unas 10^3 UFC/ml a unas 10^{11} UFC/ml, preferentemente de unas 10^5 UFC/ml a unas 10^9 UFC/ml. Los gránulos, polvo, pasta y similares se pueden aplicar tal cual están en la forma de tal formulación sin diluir.

Cuando se utilizan esporas, células vegetativas o cultivo completo de la cepa del género *Paenibacillus*, la dosis a aplicar de la misma está preferentemente entre unos 0,1 g a unos 10 000 g (peso húmedo) por cada 10 áreas. Cuando las esporas o las células vegetativas se utilizan después de diluirse con agua, la concentración de las mismas en el momento de la aplicación es preferentemente de unas 10^3 a unas 10^{10} UFC/ml. La dosis de aplicación de la sustancia capaz de inducir resistencia a enfermedades en la planta es preferentemente de unos 0,001 g a 10 000 g por cada 10 áreas. Cuando al menos un compuesto seleccionado entre compuesto 1 (fusaricidina A), compuesto 2 (fusaricidina B), compuesto 3 y compuesto 4 se utiliza después de diluirse con agua, la concentración de los mismos en el momento de la aplicación es preferentemente de 0,1 a 1000 µg/ml.

- En el control de enfermedades vegetales de acuerdo con la presente invención, la cepa del género *Paenibacillus* o la sustancia capaz de inducir resistencia a enfermedades en las plantas de la presente invención se aplica preferentemente a los tallos y a las hojas, a la zona de enraizamiento y/o a las semillas de una planta. Para aplicar realmente la cepa o sustancia, hay, por ejemplo, métodos convencionales tales como un método de aplicación de 5 gránulos al pie de la planta o al suelo y un método de aplicación de un líquido diluido o un líquido sin diluir al pie de una planta o al suelo. Además de estos métodos, se puede adoptar, por ejemplo, el mismo método de pulverización como método para controlar enfermedades en la parte aérea de la planta; un método para recubrir o sumergir las 10 semillas de la planta en una mezcla de cada una de las cepas del género *Paenibacillus* o sustancia capaz de inducir resistencia a enfermedades en las plantas de la presente invención, un vehículo sólido, un adherente denominado aglutinante, y similares; un método para aplicar la cepa o sustancia en mezcla con un fertilizante, un acondicionador de suelo, compostaje y similares, o para aplicar la cepa o sustancia junto a ellos sin mezclarlos; y un método para utilizar un material microbiano obtenido por adsorción de la cepa del género *Paenibacillus* o de la sustancia capaz de inducir resistencia a enfermedades en las plantas de la presente invención a un vehículo sólido y/o sin añadir a éste nutrientes orgánicos (p. ej., salvado de arroz, extracto de malta y aminoácidos), componentes de fertilizante, etc.
- 15 Tanto la aplicación de la dosis como la aplicación de la concentración de tales formulaciones varía según las condiciones tales como la clase de la formulación, un tiempo de aplicación, un sitio de aplicación, un método de aplicación, un método de cultivo, la clase de planta de cultivo, la clase de enfermedad vegetal, el grado de lesión, etc., y se pueden incrementar o disminuir independientemente de los márgenes mencionados más arriba.

El control de las enfermedades vegetales de acuerdo con la presente invención se explica más adelante con más 20 detalles y con ejemplos de la separación de las bacterias, ejemplos de producción, ejemplos de formulación, ejemplos de ensayo, ejemplos de cultivo, ejemplos de extracción, ejemplos de purificación, ejemplos de preparación y ejemplos de evaluación, pero la presente invención no se ve limitada por estos ejemplos de trabajo.

Ejemplos

Ejemplo 1 de aislamiento de bacterias

- 25 Aislamiento e identificación de las cepas nuevas *Paenibacillus* sp. BS-0048, *Paenibacillus* sp. BS-0074, *Paenibacillus polymyxa* BS-0105 y *Paenibacillus* sp. BS-0277

(1) Aislamiento de las cepas

Los suelos de la zona de enraizamiento y las raíces de tomate, berenjena, pimienta verde, pepino, melón, espinaca, fresa, rábano japonés, boniato chino y similares se recogieron de campos de cultivo en distintos lugares por todo 30 Japón. En una botella de vidrio con tapón que contiene 90 ml de agua esterilizada se colocaron 10 g del suelo de la zona de enraizamiento o la raíz, y se trató mediante ultrasonidos o agitación. La suspensión resultante se diluyó adecuadamente y 1 ml de la dilución se mezcló y diluyó con medio de agar con albúmina (0,25 g de ovoalbúmina, 1 g de D-glucosa, 0,5 g de fosfato de dipotasio, 0,2 g de sulfato de magnesio, cantidad insignificante de sulfato de hierro (III), 1 l de agua destilada, pH 6,8 a 7,0), y después se cultivó a 30 °C durante 5 a 10 días. Se aislaron las 35 colonias así formadas.

(2) Identificación de las cepas mediante un ensayo fisiocaracterológico y morfológico

Las cepas de ejemplo de la presente memoria son microorganismos aislados del suelo donde se cultiva tomate, de suelo donde se cultiva boniato chino y de suelo con aplicaciones orgánicas sucesivas, y recibieron los nombres de cepa BS-0048, cepa BS-0074, cepa BS-0105 y cepa BS-0277 a modo de código de cepa. La tabla 1 que viene a 40 continuación muestra los resultados de un ensayo fisiocaracterológico y morfológico de la cepa BS-0048, de la cepa BS-0074, de la cepa BS-0105 y de la cepa BS-0277.

Tabla 1: Resultados de un ensayo fisiocaracterológico y morfológico de las cepas BS-0048, BS-0074, BS-0105 y BS-0277

Propiedades	Cepa BS-0048	Cepa BS-0074	Cepa BS-0105	Cepa BS-0277
Forma:	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Dimensiones (µm)	0,8-1,5	0,8-1,2	0,8-1,5	0,8-1,5
Ancho (µm)	4-8	2-8	2-8	4-8
Reactividad de Gram	V	V	V	V
Forma y posición preservadas:				
Ovalada	+	+	+	+
Esférica	+	+	+	+
Centro	+	+	+	+

Extremo	+	+	+	+
Móvil	+	+	+	±
Crecimiento anaerobio	+	-	+	+
Reacción de V-P	-	-	-	-
Temperatura del crecimiento:				
Máximo (°C)	10	15	10	10
Mínimo (°C)	45	50	45	45
Intervalo de crecimiento:				
Medio a pH 5,7	+	+	+	+
Caldo nutritivo	+	+	+	+
NaCl (5%)	+	+	-	-
NaCl (7%)	-	-	-	-
NaCl (10%)	-	-	-	-
Producción de ácido a partir de azúcar:				
Glucosa	+	+	+	+
Trehalosa	+	+	+	+
Xilosa	+	+	+	+
Arabinosa	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+
Utilización de la caseína	+	+	+	+

- Aunque la cepa BS-0048 y la cepa BS-0277 eran las más similares a *B. polymyxa*, se consideró que cada una de ellas era una nueva cepa porque no tenían la misma reactividad V-P que *B. polymyxa*. Aunque la cepa BS-0105 era similar a *B. polymyxa* o *B. macerans*, se diferenciaba de estas cepas en la reactividad de V-P y por la utilización de la caseína. El resultado de identificación con un aparato de identificación BiOLOG indicó que la cepa BS-0105 correspondía a *B. macerans* y *B. polymyxa*, pero la cepa BS-0105 se consideró una cepa nueva porque era una cepa diferente que tiene poca similitud con *B. macerans* y *B. polymyxa*. Aunque la cepa BS-0074 era ligeramente más similar a *B. halodurans*, se consideró que era una cepa nueva porque había varias diferencias entre la cepa BS-0074 y *B. halodurans* con respecto a la utilización.
- 10 Como resultado del ensayo fisiocaracterológico y morfológico mencionado más arriba, las cepas BS-0048, BP-0074, BS-0105 y BS-0277 aisladas del suelo donde se cultiva tomate, del suelo de cultivo donde se cultiva boniato chino o del suelo de cultivo con aplicaciones orgánicas sucesivas se identificaron como *Bacillus* sp. y se depositaron como sigue en el Centro de Depósito de Microorganismos Patentados (IPOD, por su nombre en inglés), Industrial Technology General Research Institute (organismo administrativo independiente): la cepa BS-0048 se depositó
- 15 como *Bacillus* sp. BS-0048 (fecha de registro: 18 de junio de 2004; número de registro: FERM P-20085), la cepa BS-0074 se depositó como *Bacillus* sp. BS-0074 (fecha de registro: 18 de junio de 2004; número de registro: FERM P-20086), la cepa BS-0105 se depositó como *Bacillus* sp. BS-0105 (fecha de registro: 18 de junio de 2004; número de registro: FERM P-20087) y la cepa BS-0277 se depositó como *Bacillus* sp. BS-0277 (fecha de registro: 18 de junio de 2004; número de registro: FERM P-20088).
- 20 (3) Identificación mediante el análisis de la secuencia de bases del ADNr 16S
- Se determinó la secuencia de las bases (unas 1500 pb) del ADNr 16S (gen del ARNr 16S) de la cepa *Bacillus* sp. BS-0105 y se buscó la homología de la secuencia de bases determinada en la base de datos de cepas tipo bacterianas y GenBank/DDBJ/EMBL. Como resultado, la secuencia de bases del ADNr 16S de la cepa *Bacillus* sp. BS-0105 era más homóloga al ADNr 16S de *Paenibacillus polymyxa*, con un porcentaje de homología del 98,7%. Se
- 25 llevó a cabo el análisis de la filogenia molecular mediante la preparación de un árbol filogenético molecular y, como resultado, se consideró que la cepa BS-0105 tenía muchas probabilidades de estar estrechamente emparentada con *P. polymyxa*. Además, se compararon la cepa BS-0105 y una cepa tipo de *P. polymyxa* con respecto a los valores de homología de ADN-ADN mediante hibridación, encontrándose que la cepa BS-0105 tenía un porcentaje de homología del 70% o más con la cepa tipo.
- 30 Basándose en los hechos anteriores, se identificó que la cepa *Bacillus* sp. BS-0105 era *Paenibacillus polymyxa*,

aunque mostrara poca homología como resultado de la identificación con un equipo de identificación BioLOG. Por consiguiente, la cepa *Bacillus* sp. BS-0105 se denominó *Paenibacillus polymyxa* BS-0105.

- Se determinó la secuencia de bases parcial (unas 500 pb) del ADNr 16S (gen del ARNr 16S) de cada una de las cepas de *Bacillus* sp. BS-0048, BS-0074 y BS-0277, y se buscó homología de las secuencias de bases determinadas en las bases de datos de cepas tipo bacterianas y GenBank/DDBJ/EMBL. Como resultado, la secuencia de bases del ADNr 16S de cada una de las cepas de *Bacillus* sp. BS-0048 y BS-0277 presentaba la mayor homología con el ADNr 16S de *Paenibacillus polymyxa* con un porcentaje de homología del 98,5% y del 97,5%, respectivamente. La secuencia de bases del ADNr 16S de la cepa de *Bacillus* sp. BS-0074 presentaba la mayor homología con el ADNr 16S de *Paenibacillus elgii* a un porcentaje de homología del 98,4%.
- Independientemente de la base de datos que se utilizara para identificar la homología, los ADNr 16S de las 30 cepas con más homología con cada una de las cepas de *Bacillus* sp. BS-0048, BS-0074 y BS-0277 procedían de *Paenibacillus*. El análisis de la filogenia molecular se llevó a cabo preparando un árbol filogenético molecular para hallar que las cepas de *Bacillus* sp. BS-0048 y BS-0277 estaban incluidas en un agrupamiento que incluía *P. polymyxa* como la figura central, y que la cepa de *Bacillus* sp. BS-0048 aparecería en la misma rama filogenética que *P. elgii*.

Basándose en los hechos anteriores, se identificaron las cepas de *Bacillus* sp. BS-0048, BS-0074 y BS-0277 como cepas del género *Paenibacillus*. Por lo tanto, se denominaron *Paenibacillus* sp. BS-0048, *Paenibacillus* sp. BS-0074 y *Paenibacillus* sp. BS-0277, respectivamente.

- De acuerdo con el nuevo nombre que se acaba de mencionar, los nombres de las cepas depositadas en el Centro de Depósito de Organismos Patentados (IPOD), IPOD (organismo administrativo independiente) Industrial Technology General Research Institute, Chuo-dairoku, Higashi 1-1-1, Ciudad de Tsukuba, Prefectura de Ibaraki, Japón 305-8566 se cambiaron por los nuevos nombres, y el depósito interno de estas cepas se cambió al depósito internacional basado en el Tratado de Budapest. Como resultado, la cepa BS-0048, la cepa BS-0074, la cepa BS-0105 y la cepa BS-0277 se depositaron como sigue en el Centro de Depósito de Organismos Patentados (IPOD), IPOD (organismo administrativo independiente) Industrial Technology General Research Institute, Chuo-dairoku, Higashi 1-1-1, Ciudad de Tsukuba, Prefectura de Ibaraki, Japón 305-8566: la cepa BS-0048 se depositó como *Paenibacillus* sp. BS-0048 (fecha de transferencia de control: 22 de julio de 2005 (22.07.2005); número de registro: IPOD FERM BP-10377), la cepa BS-0074 se depositó como *Paenibacillus* sp. BS-0074 (fecha de transferencia de control: 22 de julio de 2005 (22.07.2005); número de registro: IPOD FERM BP-10378), la cepa BS-0105 se depositó como *Paenibacillus polymyxa* BS-0105 (fecha de transferencia de control: 22 de julio de 2005 (22.07.2005); número de registro: IPOD FERM BP-10379), y la cepa BS-0277 se depositó como *Paenibacillus* sp. BS-0277 (fecha de transferencia de control: 22 de julio de 2005 (22.07.2005); número de registro: IPOD FERM BP-10380).

Ejemplo 1 de producción

- Cultivo de *Paenibacillus* sp. BS-0048, *Paenibacillus* sp. BS-0074, *Paenibacillus polymyxa* BS-0105 y *Paenibacillus* sp. BS-0277

- En un tubo de ensayo de 50 ml que contenía 10 ml del medio YPMG (10 g de D-glucosa, 1 g de extracto de carne, 3 g de extracto de levadura, 5 g de peptona, 1 l de agua destilada, pH 7,0) se inoculó la cantidad de células que se recogen en un asa de siembra a partir de células conservadas de cada una de las cepas BS-0048, BS-0105 y BS-0277 de la presente invención y luego se cultivaron durante 3 días en la oscuridad a 25 °C y en agitación a 100 rpm.
- Un matraz Erlenmeyer de 100 ml que contenía 10 ml de un medio (20 g de D-glucosa, 10 g de almidón soluble, 10 g de peptona, 10 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de malta, 15 g de harina de soja, 1 l de agua destilada) se inoculó con 0,1 ml del cultivo de cada una de las cepas BS-0048, BS-0105 y BS-0277 obtenidas mediante el precultivo descrito más arriba.

- Por otra parte, un matraz Erlenmeyer de 100 ml que contenía 10 ml del medio YPMG se inoculó con 0,1 ml del cultivo de la cepa BS-0074. Luego, todos los cultivos mencionados más arriba se incubaron durante 4 días a 200 rpm y 25 °C.

Procedimiento 2 de producción

Cultivo de *Paenibacillus polymyxa* BS-0105

- En un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de medio YPMG se inoculó la cantidad de células que se recogen en un asa de siembra a partir de células conservadas de la cepa BS-0105 de la presente invención y luego se cultivó durante 7 días en la oscuridad a 30 °C y en agitación a 100 rpm.

Ejemplo 3 de producción

Preparación del cultivo completo de *Paenibacillus polymyxa* BS-0105

- Aproximadamente 1 l del cultivo completo de la cepa BS-0105 obtenida de acuerdo con el ejemplo 1 de producción se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos para retirar los contaminantes procedentes del medio y luego se

centrifugó el sobrenadante a 8000 rpm durante 20 minutos para precipitar las células. Se lavó el precipitado con una solución salina fisiológica al 0,8% y se volvió a centrifugar a 8000 rpm durante 20 minutos. Se repitió el procedimiento anterior dos veces para obtener un precipitado celular.

Ejemplo 4 de producción

5 Preparación de polvo de células (esporas) liofilizadas de *Paenibacillus polymyxa* BS-0105

Un precipitado de células lavadas obtenido de 300 ml del mismo cultivo que se describe más arriba en el ejemplo 3 de producción se suspendió en 50 ml de agua destilada y la suspensión resultante se cargó en un liofilizador para obtener 2,13 g de polvo de células (esporas) liofilizadas que contiene una cantidad de células de $8,8 \times 10^9$ UFC/g.

Ejemplo 5 de producción

10 Preparación de polvo de células (esporas) liofilizadas de *Paenibacillus polymyxa* BS-0105

Un precipitado de células lavadas obtenidas de 300 ml del mismo cultivo que se describe más arriba en el ejemplo 3 de producción se suspendió en 50 ml de leche desnatada al 20% y la suspensión resultante se cargó en un liofilizador para obtener 11,08 g de polvo de células (esporas) liofilizadas que contiene una cantidad de células de $3,5 \times 10^9$ UFC/g.

15 Ejemplo 6 de producción

Preparación de polvo de células (esporas) liofilizadas de *Paenibacillus polymyxa* BS-0105

Un precipitado de células lavadas obtenido de 300 ml del mismo cultivo que se describe más arriba en el ejemplo 3 de producción se suspendió en 50 ml de una solución de sulfato de amonio al 5% y la suspensión resultante se cargó en un liofilizador para obtener 4,67 g de polvo de células (esporas) liofilizadas que contiene una cantidad de células de $4,3 \times 10^9$ UFC/g.

Ejemplo 7 de producción

Preparación de polvo de cultivo completo de *Paenibacillus polymyxa* BS-0105

Mediante la liofilización de 100 ml del cultivo completo obtenido de acuerdo con el ejemplo 2 de producción, se obtuvieron 3,56 g de polvo de cultivo completo que contienen una cantidad de células de $4,1 \times 10^9$ UFC/g.

25 Los ejemplos de formulación se ofrecen a continuación. El término «partes» son por peso.

Ejemplo 1 de formulación

Preparación de un polvo hidratable

Unas 60 partes (peso seco) de la bacteria de la presente invención obtenida de acuerdo con cada uno de los ejemplos de producción 4, 5, 6 y 7 se mezcló con 20 partes de harina de soja, 10 partes de peptona y 10 partes de D-glucosa para obtener un polvo hidratable con las células.

Ejemplo 2 de formulación

Preparación de un polvo hidratable

Unas 80 partes (peso seco) de la bacteria de la presente invención obtenidas de acuerdo con cada uno de los ejemplos 4 y 5 de producción se mezcló con 20 partes de harina de soja para obtener un polvo hidratable que contiene las células.

Ejemplo 3 de formulación

Preparación de un material de cultivo

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contiene 50 ml de medio YPMG se inoculó la cantidad de células que se recogen en un asa de siembra a partir de células conservadas de la cepa BS-0105 de la presente invención y luego se cultivaron durante 6 días a 30 °C en agitación a 100 rpm. Posteriormente se mezclaron zeolita y harina de soja en la proporción de 9:1, y 200 g de la mezcla se colocaron en un bote de mayonesa, a continuación se añadieron 50 ml de agua, y se esterilizó la mezcla resultante a 121 °C durante 30 minutos. Al material así obtenido se le añadió 1 ml del cultivo obtenido mediante el precultivo descrito más arriba, y se incubó a 30 °C durante 10 días para obtener un material de cultivo que contiene una cantidad de células de la cepa BS-0105 de 10^9 UFC/g.

45 El hecho de que el método para controlar las enfermedades vegetales de la presente invención tenga un efecto controlador de las enfermedades vegetales se demuestra a continuación con los ejemplos de ensayo.

Ejemplo 1 de ensayo

Ensayo para el efecto de un cultivo de cada cepa sobre el control de la antracnosis del pepino

- Cada una de las macetas de plástico se llenó con un compost hortícola y se sembró con pepino (cultivar: Suyo), y después se hizo crecer en un invernadero durante 20 días. El cotiledón de la plántula joven de pepino que tiene una primera hoja verdadera desarrollada se cubrió con 0,1 ml de cultivo completo de cada una de las cepas BS-0048, BS-0074, BS-0105 y BS-0277 preparado mediante el método descrito en el ejemplo 1 de producción. Después de que las macetas se dejaran reposar en un invernadero a 25 °C durante 3 días, se inocularon las plantas con una suspensión de conidios del hongo de la antracnosis del pepino en agua destilada (*Colletotrichum orbiculare*, 1×10^6 esporas/ml) mediante pulverización. Las macetas se depositaron en una cámara húmeda en la oscuridad a 25 °C durante 24 horas y luego en un invernadero a 25 °C durante 7 días para provocar la enfermedad. Se contaron las lesiones en la primera hoja verdadera de cada plántula y se calculó el valor protector a partir del número de lesiones mediante la ecuación que viene a continuación para hacer una comparación respecto al efecto controlador. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Valor protector = $[1 - (\text{número de lesiones en el conjunto tratado} / \text{número de lesiones en el conjunto sin tratar})] \times 100$

- Tabla 2: Ensayo para el efecto de un cultivo de cada cepa sobre el control de la antracnosis del pepino

Cepa n.º	Número de lesiones	Valor protector
Cepa BS-0048	39,5	74,3
Cepa BS-0074	31,5	79,5
Cepa BS-0105	31,5	79,5
Cepa BS-0277	38,5	74,9
Acibenzolar-S-metil a 20 ppm	5	96,7
Sin tratar	153,5	–

Como queda claro a partir de los resultados mostrados en la tabla 2, cuando el cotiledón se trató con el cultivo de cada bacteria de la presente invención, el cultivo controló notablemente la infección de la primera hoja verdadera, como el acibenzolar-S-metil, un controlador que se conoce bien.

Ejemplo 2 de ensayo

Ensayo para el efecto de las esporas purificadas sobre el control de la antracnosis del pepino

- Cada una de las macetas de plástico se relleno con compost hortícola y se sembró con pepino (cultivar: Suyo), y a continuación se dejó crecer en un invernadero durante 20 días. La plántula joven de pepino en la que se ha desarrollado una segunda hoja verdadera se sometió a un tratamiento de aplicación foliar de una muestra de preparación de esporas de la cepa BS-0105 obtenida mediante la formulación de la bacteria de la presente invención producida mediante el método descrito en cada uno de los ejemplos 4, 5, 6 y 7 de producción, mediante el método descrito en el ejemplo 1 de formulación, por lo que la proporción de células podría ser de 2×10^7 UFC/ml. Después de que las macetas se dejaran reposar en una cámara húmeda en la oscuridad a 25 °C durante 24 horas y luego en un invernadero a 25 °C durante 4 días, se inocularon las plantas con una suspensión de conidios del hongo de la antracnosis del pepino en agua destilada (*Colletotrichum orbiculare*, 1×10^6 esporas/ml) mediante pulverización. Las macetas se dejaron reposar en una cámara húmeda en la oscuridad a 25 °C durante 24 horas y luego en un invernadero a 25 °C durante 7 días para provocar la enfermedad. Se contaron las lesiones en cada hoja y se calculó el valor protector a partir del número de lesiones mediante la ecuación que viene a continuación para hacer una comparación respecto al efecto controlador. Los resultados se muestran en la tabla 3.

- Valor protector = $\{1 - (\text{número de lesiones en el conjunto tratado} / \text{número de lesiones en el conjunto sin tratar})\} \times 100$

Tabla 3: Efecto de la antracnosis del pepino sobre el control de la cepa BS-0105

Sustrato tratado	Formulación	Primera hoja verdadera		Segunda hoja verdadera	
		Número de lesiones por hoja	Valor protector	Número de lesiones por hoja	Valor protector
Células de la cepa BS-0105 a 2×10^7 UFC/ml	Ejemplo 4 de producción	2,5 b	99	0 c	100
	Ejemplo 5 de producción	4,3 b	98,2	0,5 c	99,9
	Ejemplo 6 de producción	8,5 b	96,6	0 c	100
	Ejemplo 7 de producción	0 b	100	0 c	100
Polvo hidratable Impression a 2×10^7 UFC/ml	-	233 a	5,7	225,7 b	58,5
Acibenzolar-S-metil a 20 ppm	-	0 b	100	5,5 c	99
Sin tratar	-	247 a		544 a	

En la tabla 3, los números con la misma letra del alfabeto indican que no había ninguna diferencia significativa entre ellos (nivel de significación: 0,05).

Como queda patente a partir de los resultados mostrados en la tabla 3, todas las formulaciones compuestas principalmente por la bacteria de la presente invención mostraron un efecto controlador igual o mejor que el de un polvo hidratable Impression y el del acibenzolar-S-metil, que son controladores que se conocen bien.

Ejemplo 3 de ensayo

5 Ensayo para el efecto de las esporas purificadas sobre el control del tizón bacteriano del pepino

Cada una de las macetas de plástico se llenó con compost hortícola y se sembró con pepino (cultivar: Suyo), y a continuación se dejaron crecer en un invernadero durante 20 días. A la plántula joven del pepino que había desarrollado una segunda hoja verdadera se le aplicó en las hojas una muestra de la preparación de esporas de la cepa BS-0105 obtenida mediante la formulación de la bacteria de la presente invención producida por el método descrito en el ejemplo 5 de producción, mediante el método descrito en el ejemplo 1 de formulación, por lo que la proporción de células podría ser de 2×10^7 UFC/ml. Después de dejar reposar las macetas en una cámara húmeda en la oscuridad a 25 °C durante 24 horas y luego en un invernadero a 25 °C durante 4 días, se inocularon las plantas con una suspensión (1×10^8 UFC/ml) de bacteria del tizón bacteriano del pepino (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) en agua destilada mediante pulverización. Se dejaron reposar las macetas en una cámara húmeda en la oscuridad a 25 °C durante 24 horas y luego en un invernadero a 25 °C durante 7 días para provocar la enfermedad. Se contaron las lesiones en la segunda hoja verdadera de cada plántula y se calculó el valor protector del número de lesiones mediante la ecuación que viene a continuación para hacer una comparación respecto al efecto controlador. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Valor protector = $\{1 - (\text{número de lesiones en el conjunto tratado} / \text{número de lesiones en el conjunto sin tratar})\} \times 100$

20 Tabla 4: Efecto de la cepa BS-0105 sobre el control del tizón bacteriano del pepino

Conjunto tratado	Número de lesiones por hoja	Valor protector
Células de la cepa BS-0105 2×10^7 UFC/ml	2,2 b	92,6
Polvo hidratable Impression 2×10^7 UFC/ml	50 a	0
Acibenzolar-S-metil a 20 ppm	0 b	100
Sin tratar	29,3 a	–

En la tabla 4, los números con la misma letra del alfabeto indican que no hubo ninguna diferencia significativa entre ellos (nivel de significación: 0,05).

Como queda patente a partir de los resultados mostrados en la tabla 4, la formulación compuesta principalmente por la bacteria de la presente invención mostró un efecto controlador igual o mejor que el de un polvo hidratable Impression y el del acibenzolar-S-metil, que son controladores que se conocen bien.

Ejemplo 4 de ensayo

Ensayo para el efecto de las esporas purificadas sobre el control de la antracnosis de la fresa

A las plántulas de la fresa (cultivar: Akihime) cultivadas en macetas de plástico y que tienen unos 10 folíolos desarrollados se les aplicó en las hojas una muestra de preparación de esporas de la cepa BS-0105 obtenida mediante la formulación de la bacteria de la presente invención producida por el método descrito en el ejemplo 5 de producción, mediante el método descrito en el ejemplo 2 de formulación, por lo que la proporción de células podría ser de 2×10^7 UFC/ml. Después de que las macetas se dejasen reposar en una cámara húmeda en la oscuridad a 25 °C durante 24 horas y luego en un invernadero a 25 °C durante 3 días (o 1 día en el caso de la pasta líquida Amister 20), las plantas se inocularon con una suspensión de conidios del hongo de la antracnosis de la fresa en agua destilada (*Glomerella cingulata*, 2×10^6 esporas/ml) mediante pulverización. Las macetas se dejaron reposar en una cámara húmeda en la oscuridad a 25 °C durante 24 horas y luego en un invernadero a 25 °C durante 14 días para provocar la enfermedad. Se calculó la intensidad de la enfermedad mediante la ecuación que viene a continuación y se calculó el valor protector de los valores de la intensidad de la enfermedad mediante la ecuación que viene a continuación para compararlo con respecto al efecto controlador. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Gravedad de la enfermedad = $(\sum \text{índice de intensidad de la enfermedad} \times \text{número de plántulas pertinentes} / 4 \times \text{número de plántulas inspeccionadas}) \times 100$

Índice 0 de intensidad de la enfermedad: no hay infección; índice 1 de intensidad de la enfermedad: se observaron unas pocas manchas pequeñas en un folíolo; índice 2 de intensidad de la enfermedad: se observaron un gran

número de manchas pequeñas en los tallos y en las hojas; índice 3 de intensidad de la enfermedad: había presentes manchas grandes claramente visibles en los tallos y las hojas; índice 4 de intensidad de la enfermedad: marchitamiento y secado hasta morir.

- 5 Valor protector = $\{1 - (\text{intensidad de la enfermedad en el conjunto tratado} / \text{intensidad de la enfermedad en el conjunto sin tratar})\} \times 100$

Tabla 5: Efecto de la cepa BS-0105 sobre el control de la antracnosis de la fresa

Conjunto tratado	Intensidad de la enfermedad	Valor protector
Células de la cepa BS-0105 a 2×10^7 UFC/ml	1,6 b	97,9
Pasta líquida Amister-20 a 100 ppm	3,1 b	95,8
Acibenzolar-S-metil a 20 ppm	10,9 b	85,1
Sin tratar	73,4 a	—

En la tabla 5, los números con la misma letra del alfabeto indican que no hubo ninguna diferencia significativa entre ellos (nivel de significación: 0,05).

- 10 Como queda patente de los resultados mostrados en la tabla 5, la formulación compuesta principalmente por la bacteria de la presente invención mostró una intensidad de la enfermedad más baja y un efecto controlador más elevado de lo que lo hizo la pasta líquida Amister 20 y el acibenzolar-S-metil, que son controladores que se conocen bien.

Ejemplo 5 de ensayo

- 15 Ensayo para el efecto de un caldo de cultivo sobre el control del tizón bacteriano del melón

Cada una de las bandejas de invernadero se llenó con Aisai n.º 1 (fabricado por Katakura Chikkarin Co., Ltd.) y se hizo crecer una plántula de melón (cultivar: Arles) en cada bandeja. En este caso, se preparó un conjunto con tratamiento de las semillas mediante la introducción de las semillas de melón en una placa de Petri que contenía 10 ml (10^8 esporas/ml) del caldo de cultivo de la cepa BS-0105 preparada en el ejemplo 2 de producción, seguido de la proliferación bacteriana a 30 °C durante 2 horas. Después del desarrollo de un cotiledón, la plántula se sembró en una maceta de polietileno de 12 cm con Aisai n.º 1. Cuando se hubieron desarrollado completamente tres hojas verdaderas, se prepararon los conjuntos siguientes: conjuntos en los cuales se llevó a cabo el tratamiento por empapamiento o por pulverización foliar, respectivamente, con 1 ml (10^8 esporas/ml) del caldo de cultivo de la cepa BS-0105 preparado en el ejemplo 2 de producción, y un conjunto en el que se llevó a cabo una pulverización foliar de 2 ml de una solución a 2 ppm de acibenzolar-S-metil. En lo que se refiere a la inoculación de la bacteria patógena (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*), 5 días después del tratamiento, un líquido que contenía la bacteria del tizón bacteriano previamente cultivado en un medio semisintético de patata (una decocción que consiste en 300 g de patata y 1 l de agua destilada, 0,5 g de nitrato de calcio tetrahidratado, 2 g de hidrogenofosfato de disodio dodecahidratado, 5 g de peptona, 20 g de sacarosa, 15 g de agar en polvo) se inoculó sobre cada hoja en su totalidad pulverizándola de modo que el envés recibiera la mayor parte del tratamiento. La inspección para la infección se llevó a cabo contando las lesiones en cada una de las hojas desde la segunda a la cuarta hoja 8 días después de la inoculación con la bacteria patógena. Se calculó el valor protector a partir del número de lesiones mediante la ecuación que viene a continuación para hacer una comparación respecto al efecto controlador. Los resultados se muestran en la tabla 6.

- 35 Valor protector = $\{1 - (\text{número de lesiones en el conjunto tratado} / \text{número de lesiones en el conjunto sin tratar})\} \times 100$

Tabla 6: Efecto de la cepa BS-0105 sobre el control del tizón bacteriano del melón

Conjunto tratado	Valor protector			
	Segunda hoja	Tercera hoja	Cuarta hoja	Promedio
Tratamiento de las semillas con la cepa BS-0105	28,0	65,3	59,5	50,9
Aplicación foliar de la cepa BS-0105	100,0	53,1	-	51,0
Tratamiento por empapamiento con la cepa BS-0105	100,0	81,3	88,9	90,0
Acibenzolar-S-metil a 2 ppm	100,0	68,8	66,7	78,5

Como queda patente a partir de los resultados mostrados en la tabla 6, el cultivo de la bacteria de la presente invención mostró un efecto controlador igual o mejor que el del acibenzolar-S-metil, un controlador que se conoce bien, cuando se trataron con el cultivo antes mencionado mediante cualquiera de los tratamientos (de las semillas, por pulverización foliar y por empapamiento).

5 Ejemplo 6 de ensayo

Ensayo para el efecto de un caldo de cultivo sobre el control del marchitamiento por *Fusarium* del melón

Cada una de las bandejas de invernadero se llenó con Aisai n.º 1 y se cultivó una plántula de melón (cultivar: Prince) en cada bandeja. En este caso, las semillas de melón se habían sumergido en una placa de Petri que contenía 10 ml (10⁸ esporas/ml) del caldo de cultivo de la cepa BS-0105 preparada en el ejemplo 2 de producción, y a continuación se hicieron crecer las bacterias a 30 °C durante 2 horas. Después del desarrollo de un cotiledón, la plántula se trasplantó a una maceta de polietileno de 10,5 cm llena de suelo infectado con el hongo del marchitamiento por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*), seguido del empapamiento con el caldo de cultivo de *Bacillus* sp. BS-0105 preparado en el ejemplo 2 de producción, en una proporción de 1 ml/maceta (10⁸ macetas/ml). En el caso del polvo hidratable Benlate, se llevó a cabo el tratamiento de empapamiento con 2 ml de una dilución de 1000 veces (concentración: 500 ppm) del polvo hidratable. Se calculó la intensidad de la enfermedad mediante la ecuación que viene a continuación y se calculó el valor protector a partir de los valores de intensidad de la enfermedad con la ecuación que viene después para hacer una comparación con respecto al efecto controlador. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Gravedad de la enfermedad = (Índice de intensidad de la enfermedad x número de plántulas / 4 x número de plántulas) x 100

Índice de gravedad de la enfermedad: clasificado en la escala siguiente de cero a cuatro: 0 (sano), 1 (leve), 2 (moderado), 3 (grave) y 4 (secado hasta morir).

Valor protector = {1 – (intensidad de la enfermedad en cada conjunto tratado/intensidad de la enfermedad en el conjunto sin tratar)} x 100

25 Tabla 7: Efecto de la cepa BS-0105 sobre el control del marchitamiento por *Fusarium* del melón

Conjunto tratado	Porcentaje de plántulas infectadas	Intensidad de la enfermedad	Valor protector
Cepa BS-0105 + empapamiento	40	25	61,5
Polvo hidratable Benlate a 500 ppm	20	5	92,3
Sin tratar	80	65	–

Como queda patente a partir de los resultados mostrados en la tabla 7, el cultivo de la bacteria de la presente invención mostró un efecto controlador igual al del polvo hidratable Benlate, un controlador que se conoce bien, cuando se utilizó para los tratamientos de las semillas y por empapamiento.

30 Los ejemplos siguientes se ofrecen como métodos para obtener el compuesto 1 (fusaricidina A) y el compuesto 2 (fusaricidina B) a partir de un cultivo de *Paenibacillus* sp. BS-0048, *Paenibacillus* sp. BS-0074, *Paenibacillus polymyxa* BS-0105 o *Paenibacillus* sp. BS-0277.

Ejemplo 1 de cultivo

Cultivo de *Paenibacillus polymyxa* BS-0105

35 La cantidad de células que se recogen en un asa de siembra a partir de células conservadas de la cepa BS-0105 de la presente invención se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 100 ml que contiene 10 ml de medio YPMG (10 g de D-glucosa, 1 g de extracto de carne, 3 g de extracto de levadura, 5 g de peptona, 1 l de agua destilada, pH 7,0) y luego se cultivó durante 3 días en la oscuridad a 25 °C y a 200 rpm. Un matraz Erlenmeyer de 100 ml que contiene 10 ml de un medio de producción (20 g de D-glucosa, 10 g de harina de soja, 5 g de licor de maíz fermentado, 2,5 g de glicerol, 2,5 g de almidón de maíz, 1 g de extracto de levadura, 1 g de NaCl, 1 g de CaCO₃, 1 l de agua destilada, pH 7,0) se inoculó con 0,5 ml del cultivo obtenido mediante el precultivo descrito más arriba, y a continuación se agitó el cultivo durante 4 días a 25 °C a 200 rpm.

Ejemplo 1 de extracción

Extracción de un caldo de cultivo de *Paenibacillus polymyxa* BS-0105

45 Después de que 300 ml del caldo de cultivo se sometiera a extracción durante una noche mediante agitación con un

volumen igual de butanol, la solución de extracto en butanol resultante se concentró en un rotavapor. Se extrajo el extracto con acetato de etilo/agua destilada y luego se extrajo la capa acuosa con butanol/agua destilada. Se recuperó la capa de butanol y entonces se concentró hasta secarla completamente.

Ejemplo 1 de purificación

5 Purificación de una mezcla del compuesto 1 (fusaricidina A) y del compuesto 2 (fusaricidina B)

El extracto bruto se disolvió en 4 ml de sulfóxido de dimetilo y se purificó mediante HPLC. Las condiciones de la HPLC fueron las que vienen a continuación. Es decir, utilizando acetonitrilo-TFA al 0,1% (v/v) (35:65) como fase móvil y un Senshu Pak PEGASIL ODS2 20 x 250 mm como columna, la separación por HPLC se llevó a cabo en las condiciones siguientes: inyección de volumen para un ciclo de 0,1 ml, temperatura de la columna a 40 °C y velocidad del flujo de 9 ml/min. Se recuperó un compuesto a un tiempo de retención de 23 minutos y a continuación se concentró hasta secarlo completamente para obtener 60,7 mg de una mezcla que contenía el compuesto 1 y el compuesto 2 en la proporción de 3:2.

Identificación del compuesto 1 (fusaricidina A) y del compuesto 2 (fusaricidina B)

La mezcla que contenía el compuesto 1 y el compuesto 2 en la proporción de 3:2 se disolvió en DMSO-D₆, seguido de una medición de ¹³C-RMN. Como resultado, se encontró que los valores medidos de ¹³C-RMN así obtenidos concordaban con los de la fusaricidina A y la fusaricidina B descritos en los documentos 4 y 5 que no son patente. La tabla 8 muestra los datos de los desplazamientos químicos para el compuesto 1 (fusaricidina A) y para el compuesto 2 (fusaricidina B).

Tabla 8: datos de los desplazamientos químicos para el compuesto 1 (fusaricidina A) y para el compuesto 2 (fusaricidina B)

Fusaricidina A			Fusaricidina B		
Resto	Posición	δc	Resto	Posición	δc
L-Thr (1)	1	56,7	L-Thr (1)	1	56,7
	2	70,3		2	70,1
	3	16,2		3	16,5
	4	168,4		4	168,1
D-Val (1)	5	57,0	D-Val (1)	5	56,9
	6	31,5		6	31,5
	7	18,2		7	17,9
	8	19,0		8	19,0
	9	170,8		9	171,0
L-Val (2)	10	57,8	L-Val (2)	10	58,5
	11	30,1		11	29,6
	12	18,0		12	18,2
	13	19,2		13	19,9
	14	172,9		14	172,3
D-alo-Thr (2)	15	60,2	D-alo-Thr (2)	15	59,5
	16	65,6		16	65,6
	17	19,5		17	19,7
	18	170,3		18	170,3
D-Asn	19	50,4	D-Gln	19	52,7
	20	36,5		20	26,1
	21	172,4		21	31,8
	22	169,6		22	174,3
				23	170,5

D-Ala	23	47,7	D-Ala	24	47,8
	24	17,2		25	17,2
	25	170,5		26	170,5
GHPD	26	171,9	GHPD	27	17,20
	27	43,0		28	43,3
	28	67,5		29	67,5
	29	36,7		30	36,7
	30	25,2		31	25,2
	31-37	28,6		32-38	28,6
		29,0			29,0
		29,1			29,0
	38	26,0		39	26,0
	39	28,4		40	28,4
	40	40,7		41	40,7
	41	156,7		42	156,7

GHPD: ácido 15-guanidino-3-hidroxipentadecanoico

Ejemplo 2 de purificación

Producción del compuesto 1 (fusaricidina A) y del compuesto 2 (fusaricidina B) a partir de *Paenibacillus* sp. BS-0048, *Paenibacillus* sp. BS-0074 y *Paenibacillus* sp. BS-0277

Las cepas BS-0048, BS-0074, BS-0105 y BS-0277 se cultivaron de acuerdo con el ejemplo 1 de cultivo mencionado más arriba. Después de extraer durante una noche 10 ml del caldo de cultivo así obtenido de cada cepa mediante agitación con un volumen igual de butanol, la solución del extracto en butanol resultante se concentró en un rotavapor. Se disolvió el extracto en 1 ml de sulfóxido de dimetilo, seguido de análisis de LC/MS (los analizadores de LC y MS son NANOSPACE SI-2 (Shiseido) y FINIGAN LCQ^{DUO} (Thermo Quest)). En lo que se refiere a las condiciones de análisis mediante HPLC, se usó una solución acuosa de acetonitrilo al 27% que contenía TFA (ácido trifluoroacético) al 0,1% como fase móvil y CAPCELL PAK C₁₈ UG120 3 µm 2,0 x 100 mm (Shiseido) como columna, se llevó a cabo la separación a un volumen de inyección de 3 µl para un ciclo, a una temperatura de columna de 40 °C y a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min, y entonces se llevó a cabo la medición de la masa molecular en las condiciones que vienen a continuación. Es decir, la medición se llevó a cabo en condiciones de una temperatura capilar de 245 °C, de un voltaje capilar de 10 V, de una velocidad de flujo del gas en la camisa de 95 arb, de una velocidad de flujo del gas auxiliar de 10 arb, de un voltaje de pulverización de 5 kV y de un voltaje del multiplicador de electrones de 700 V. Como resultado, se detectó un pico de molécula ionizada que correspondía a una masa molecular de 883 (M+H)⁺ con un tiempo de retención de 18,5 minutos y un pico de molécula ionizada que correspondía a una masa molecular de 897 (M+H)⁺ con un tiempo de retención de 17,8 minutos, en el caso del extracto de cultivo de cualquiera de las cepas BS-0048, BS-0074, BS-0105 y BS-0277. En el caso de la mezcla del compuesto 1 y el compuesto 2 descrita en el ejemplo 1 de purificación también se detectaron los mismos picos de moléculas ionizadas que más arriba con los mismos tiempos de retención, respectivamente, que más arriba. Con estos resultados y el resultado de la medición de ¹³C-RMN mencionada más arriba se confirmó que la sustancia detectada a un tiempo de retención de 18,5 minutos era la fusaricidina A y que la sustancia detectada a un tiempo de retención de 17,8 minutos era la fusaricidina B.

Ejemplo 1 de preparación

Preparación de un concentrado soluble

La mezcla del compuesto 1 y del compuesto 2 en la proporción de 3:2 se disolvió en sulfóxido de dimetilo y la solución resultante se diluyó a una concentración deseada con agua destilada.

Ejemplo 1 de evaluación

Evaluación de una actividad inductora de resistencia a enfermedades vegetales

Siegrist, J. et al (*Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53, 223-238: 1998) han puesto de manifiesto que la capacidad de respuesta a la inducción mejora con el acibenzolar-S-metil, una sustancia capaz de inducir resistencia

a enfermedades vegetales, al adoptar un método en el que la capacidad de respuesta a la inducción que tienen células cultivadas de perejil se mide mediante la detección de la fitoalexina por fluorescencia, en un sistema experimental modelo para investigar una actividad inductora de resistencia a enfermedades en la planta. La actividad inductora de resistencia a enfermedades en la planta que tienen el compuesto 1 y el compuesto 2 de acuerdo con la presente invención también se evaluó de acuerdo con el método de Siegrist, J. et al. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9: Resultados de la detección de la fitoalexina

Tratamiento inductor	Conjunto tratado con compuesto	Concentración (µM)	Fluorescencia relativa
Sí	Compuesto 1 + compuesto 2 (3:2)	0,1 + 0,07	995,1
	Acibenzolar-S-metil	2,5	754,3
	Sin tratar-1	–	409,8
No	Compuesto 1 + compuesto 2 (3:2)	0,1 + 0,07	104,6
	Acibenzolar-S-metil	2,5	ST
	Sin tratar-2	–	87,5

ST: Sin tratar.

10 A partir de los resultados mostrados en la tabla 9, quedó claro que el compuesto 1 y el compuesto 2 mejoran la capacidad de respuesta a la inducción que tienen células cultivadas de perejil de igual forma que lo hace la sustancia existente que tiene una actividad inductora de resistencia a enfermedades en la planta y, por lo tanto, tienen una actividad inductora de resistencia a enfermedades en la planta.

Ejemplo 2 de evaluación

15 Ensayo de la actividad antimicrobiana contra la bacteria del tizón bacteriano del pepino

Se investigó si el compuesto 1 y el compuesto 2 mostraban una actividad antimicrobiana directa contra la bacteria del tizón bacteriano del pepino (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*). Es decir, la bacteria del tizón bacteriano del pepino se mezcló con un medio semisintético de patata (una decocción que consiste en 300 g de patata y 1 l de agua destilada, 0,5 g de nitrato de calcio tetrahidratado, 2 g de hidrogenofosfato de sodio dodecahidratado, 5 g de peptona, 20 g de sacarosa, 15 g de agar en polvo) mantenido a 45 °C, en una proporción de 1 x 10⁹ UFC/ml, y la mezcla resultante se dispensó en alícuotas de 20 ml en placas de Petri esterilizadas. Después de la solidificación del medio, 50 µl de una solución obtenida disolviendo una mezcla 3:2 de los compuestos 1 y 2 en sulfóxido de dimetilo a una concentración de 100µg/ml se infiltró en un disco de papel con un diámetro de 8 mm y luego se depositó el disco de papel sobre el medio. Después de 48 horas de cultivo a 25 °C en la oscuridad, se evaluó la actividad basándose en la presencia de una zona de inhibición alrededor de la periferia del disco de papel. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: Actividad antimicrobiana directa contra la bacteria del tizón bacteriano del pepino

Conjunto tratado con compuesto	Concentración (ppm)	Presencia de zona de inhibición
Compuesto 1 + compuesto 2 (3:2)	60 + 40	No
Sulfóxido de dimetilo	–	No

30 A partir de los resultados mostrados en la tabla 10, se puso de manifiesto que el compuesto 1 y el compuesto 2 no muestran actividad antimicrobiana directa contra la bacteria del tizón bacteriano del pepino.

Ejemplo 3 de evaluación

Ensayo para el efecto controlador sobre el tizón bacteriano del pepino

35 Cada una de las macetas de plástico se llenó con compost hortícola y se sembró con pepino (cultivar: Suyo), y a continuación se hizo crecer en un invernadero durante 20 días. La plántula joven del pepino que presenta una segunda hoja verdadera desarrollada se sometió a un tratamiento por empapamiento del pie de la planta con la formulación obtenida en el ejemplo de preparación mencionado más arriba, a una proporción de 5 ml por plántula. Después de que las macetas se dejaran reposar en un invernadero a 25 °C durante 3 días, se inocularon por pulverización las plantas con una suspensión (1 x 10⁸ UFC/ml) en agua destilada de la bacteria del tizón bacteriano

del pepino (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*). Las macetas se depositaron en una cámara húmeda en la oscuridad a 25 °C durante 24 horas y luego en un invernadero a 25 °C durante 7 días para provocar la enfermedad. Se contaron las lesiones de cada hoja y se calculó el valor protector a partir del número de lesiones mediante la ecuación que viene a continuación para hacer una comparación con respecto al efecto controlador. Los resultados se muestran en la tabla 11.

$$\text{Valor protector} = \{1 - (\text{número de lesiones en el conjunto tratado} / \text{número de lesiones en el conjunto sin tratar})\} \times 100$$

Tabla 11: Efecto del compuesto 1 y del compuesto 2 sobre el control del tizón bacteriano del pepino

Conjunto tratado	Concentración (ppm)	Número de lesiones por hoja	Valor protector
Compuesto 1 + compuesto 2 (3:2)	12 + 8	223,8 b	65,5
	60 + 40	293 b	54,9
Acibenzolar-S-metil	20	137,8 b	78,8
Sin tratar	–	649,7 a	–

En la tabla 11, los números con la misma letra del alfabeto indican que no había ninguna diferencia significativa entre ellos (nivel de significación: 0,05).

Como queda patente de los resultados mostrados en la tabla 11, la formulación compuesta principalmente por el compuesto 1 y por el compuesto 2 de acuerdo con la presente invención mostró un excelente efecto controlador sobre el tizón bacteriano del pepino contra el cual la formulación no mostró una actividad antimicrobiana directa.

Ejemplo 4 de evaluación

15 Ensayo para la actividad antimicrobiana contra el marchitamiento por *Fusarium* del pepino

Se investigó si el compuesto 1 y el compuesto 2 mostraban actividad antimicrobiana directa contra el hongo del marchitamiento por *Fusarium* del pepino (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*). Es decir, los conidios del hongo del marchitamiento por *Fusarium* del pepino se mezclaron con un medio de agar con dextrosa de patata (Nissui Pharmaceutical) mantenido a 45 °C, a una proporción de 1×10^7 esporas/ml, y la mezcla resultante se dispensó en alícuotas de 20 ml en placas de Petri esterilizadas. Después de la solidificación del medio, en un disco de papel con un diámetro de 8 mm se infiltraron 50 µl de una solución obtenida al disolver una mezcla 3:2 de los compuestos 1 y 2 en sulfóxido de dimetilo a cada una de las concentraciones predeterminadas y a continuación el disco de papel se depositó sobre el medio. Después de 48 horas de cultivo a 25 °C en la oscuridad, se evaluó la actividad basándose en la presencia de una zona de inhibición alrededor de la periferia del disco de papel. Los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: Actividad microbiana directa contra el hongo del marchitamiento por *Fusarium* del pepino

Conjunto tratado	Concentración (ppm)	
	12 + 8	30 + 20
Compuesto 1 + compuesto 2 (3:2)	–	–
Sin tratar	–	

+: Se observa una zona de inhibición inequívoca, –: no se observa ninguna zona de inhibición.

Como queda patente a partir de los resultados mostrados en la tabla 12, la mezcla 3:2 del compuesto 1 y del compuesto 2 no mostró ninguna actividad antimicrobiana contra el hongo del marchitamiento por *Fusarium* del pepino (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*) incluso cuando los compuestos 1 y 2 se mezclaron para que su concentración fuera de 30 ppm y 20 ppm, respectivamente.

Ejemplo 5 de evaluación

Ensayo para el efecto controlador sobre el marchitamiento por *Fusarium* del pepino

35 Cada uno de los recipientes de plástico se llenó con compost hortícola y se sembró con pepino (cultivar: Sagamihanjiro), y después se dejó crecer en un invernadero durante 12 días. La plántula joven del pepino que tiene un cotiledón desarrollado se sometió a un tratamiento de pulverización foliar con la formulación obtenida en el ejemplo de preparación mencionado más arriba, a una proporción de 1 ml por plántula. Después de que los depósitos se dejaran reposar en un invernadero a 25 °C durante 3 días, el pie de cada planta se inoculó por

empapamiento con 2 ml de una suspensión (3×10^7 esporas/ml) de conidios del hongo del marchitamiento por *Fusarium* del pepino (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*) en agua destilada. Los recipientes se dejaron reposar en un invernadero a 25 °C durante 14 días para provocar la enfermedad. La intensidad de la enfermedad se calculó a partir del grado de infección y a continuación se calculó el valor protector a partir de los valores de intensidad de la enfermedad mediante la ecuación que viene a continuación para hacer una comparación con respecto al efecto controlador. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Gravedad de la enfermedad = $(\text{Índice de intensidad de la enfermedad} \times \text{número de plántulas pertinentes} / 4 \times \text{número de plántulas inspeccionadas}) \times 100$

Índice 0 de intensidad de la enfermedad: ninguna infección; índice 1 de intensidad de la enfermedad: ligeramente amarillento en una parte próxima al suelo; índice 2 de intensidad de la enfermedad: oscurecimiento prominente en una parte próxima al suelo; índice 3 de intensidad de la enfermedad: oscurecimiento prominente considerable de los tallos y crecimiento insatisfactorio de la parte que está por encima del suelo; índice 4 de intensidad de la enfermedad: marchitamiento intratable de la planta, que se va secando hasta morir.

Valor protector = $\{1 - (\text{intensidad de la enfermedad en el conjunto tratado} / \text{intensidad de la enfermedad en el conjunto sin tratar})\} \times 100$

Tabla 13: Efecto controlador sobre el marchitamiento por *Fusarium* del pepino

Conjunto tratado	Concentración (ppm)	Método de tratamiento	Gravedad de la enfermedad	Valor protector
Compuesto 1 + compuesto 2 (3:2)	12 + 8	Pulverización	11,5 b	70,2
Acibenzolar-S-metil	20	Pulverización	9,4 b	75,6
Polvo hidratable Benlate	200	Empapamiento del pie de la planta	15,6 b	59,4
Sin tratar/inoculación del hongo		–	38,5 a	–
Sin tratar/sin inoculación del hongo		–	0	–

En la tabla 13, los números con la misma letra del alfabeto indican que no había ninguna diferencia significativa entre ellos (nivel de significación: 0,05).

Como queda patente a partir de los resultados mostrados en la tabla 13, la formulación compuesta principalmente por el compuesto 1 y por el compuesto 2 de acuerdo con la presente invención controló el marchitamiento por *Fusarium* del pepino, una enfermedad del suelo en el caso del tratamiento con pulverización sobre la parte que está por encima del suelo. La formulación mostró un excelente efecto controlador en el caso del tratamiento con una mezcla del compuesto 1 y del compuesto 2 a una concentración de 12 ppm y de 8 ppm, respectivamente, que eran concentraciones a las cuales la formulación no mostró ninguna actividad antimicrobiana directa.

Ejemplo 3 de purificación

Aislamiento y purificación del compuesto 1 (fusaricidina A) y del compuesto 2 (fusaricidina B)

En 3 ml de sulfóxido de dimetilo se disolvieron 133,7 mg de una mezcla del compuesto 1 y del compuesto 2, y estos compuestos se purificaron por HPLC. Las condiciones de la HPLC fueron como se indica a continuación. Es decir, utilizando acetonitrilo-TFA al 0,1% (v/v) (29:71) como fase móvil y Shiseido CAPCELL PAK C₁₈ SG120 5 µm 4,6 x 250 mm como columna, la separación por HPLC se llevó a cabo en las condiciones siguientes: inyección de volumen para un ciclo de 0,25 ml, temperatura de la columna de 40 °C y velocidad de flujo de 1 ml/min. Los eluatos en los tiempos de retención de 20 minutos a 35 minutos se recuperaron a intervalos de 30 segundos y cada fracción se analizó mediante LC/MS. Las condiciones del análisis por HPLC fueron como se indica a continuación. Es decir, se utilizó acetonitrilo-TFA al 0,1% (v/v) (27:73) que contenía TFA (0,1%) como fase móvil y Shiseido CAPCELL PAK C₁₈ UG120 3 µm 2,0 x 100 mm como columna, se llevó a cabo la separación con un volumen de inyección para un ciclo de 0,01 ml, a una temperatura de columna de 40 °C y a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min, y entonces se midió la masa molecular en las condiciones que se indican a continuación. Es decir, la medición se llevó a cabo en condiciones de temperatura capilar de 245 °C, un voltaje capilar de 10 V, una velocidad de flujo del gas de la camisa de 95 arb, una velocidad de flujo de gas auxiliar de 10 arb, un voltaje de pulverización de 5 kV y un voltaje del electromultiplicador de 700 V.

Las fracciones que contenían el compuesto 1 se combinaron y después se concentraron hasta secarlas completamente para obtener 44,7 mg del compuesto 1. Las fracciones que contenían el compuesto 2 se combinaron y después se concentraron hasta secarlas por completo para obtener 24,8 mg del compuesto 2.

Ejemplo 6 de evaluación

Evaluación de la actividad inductora de resistencia a enfermedades en la planta que tienen tanto el compuesto 1 como el compuesto 2

- 5 La actividad inductora de resistencia a enfermedades en la planta de cada uno de los compuestos 1 y 2 se evaluó del mismo modo que en el ejemplo 1 de evaluación, al adoptar el método practicado en el ejemplo de evaluación 1, a saber, el método en el cual la capacidad de respuesta inductora de células cultivadas de perejil se midió mediante la detección de la fitoalexina por fluorescencia. Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14: Resultados de la detección de fitoalexina

Tratamiento inductor	Conjunto tratado con el compuesto	Concentración (μM)	Fluorescencia relativa
Sí	Compuesto 1	0,5	1000
	Compuesto 2	0,5	1000
	Acibenzolar-S-metil	2,5	664,8
	Sin tratar-1	–	366,2
No	Compuesto 1	0,5	98,5
	Compuesto 2	0,5	100,7
	Acibenzolar-S-metil	2,5	86,9
	Sin tratar-2	–	84,7

- 10 A partir de los resultados mostrados en la tabla 14, quedó patente que cada uno de los compuestos 1 y 2 mejora la capacidad de respuesta inductora de las células cultivadas de perejil de igual forma que la sustancia existente que tiene una actividad inductora de resistencia a enfermedades en la planta y, por lo tanto, tiene una actividad inductora de resistencia a enfermedades vegetales.

Ejemplo 2 de cultivo

- 15 Cultivo de *Paenibacillus polymyxa* BS-0105

Un matraz de 400 ml que contiene 100 ml de medio YPMG (10 g de D-glucosa, 1 g de extracto de carne, 3 g de extracto de levadura, 5 g de peptona, 1 l de agua destilada, pH 7,0) se inoculó con 100 μl de una suspensión celular conservada en congelación de la cepa BS-0105 de la presente invención, y luego se cultivó durante 1 día a 25 °C y 210 rpm. Se transfirieron e inocularon 200 ml del cultivo obtenido mediante el precultivo descrito más arriba en un fermentador que contenía 20 l de medio de producción (200 g de D-glucosa, 600 g de almidón, 50 g de sulfato de amonio, 50 g de harina de soja, 10 g de dihidrogenofosfato de potasio, 5 g de cloruro de sodio, 5 g de sulfato de magnesio, 120 g de carbonato de calcio), y después se cultivó durante 3 días a 25 °C, una velocidad de ventilación de 10 l/min y 400 rpm.

- 20 Ejemplo 2 de extracción

- 25 Extracción del compuesto 3 y del compuesto 4

A 5 l del caldo de cultivo obtenido en el ejemplo 2 de cultivo de más arriba se le añadieron 5 l de isopropanol y 1 l de cloruro de calcio a 1 mol/l, y se filtró la mezcla resultante para obtener unos 10 l de una solución de extracto. Después de concentrar los 5 l de la solución de extracto en 500 ml, se extrajo el concentrado con 500 ml de butanol, y la capa de butanol se extrajo tres veces con 200 ml de agua destilada para obtener 600 ml de una capa acuosa. La capa acuosa se concentró en un rotavapor y la capa acuosa resultante se cargó en una columna de gel de sílice de octadecilo. Se lavó la columna con agua, y después se eluyó con soluciones acuosas de acetonitrilo del 10 al 25%. El eluato se concentró para obtener un extracto bruto.

- 30 Ejemplo 4 de purificación

Aislamiento y purificación del compuesto 3 y del compuesto 4

- 35 El extracto bruto obtenido en el ejemplo 2 de extracción de más arriba se disolvió en 4 ml de metanol al 50% y se purificó por HPLC. Las condiciones de la HPLC son las que se indican a continuación. Es decir, se utilizó acetonitrilo:TFA al 0,1% (v/v) (32:68) como fase móvil e Inertsil ODS 20 x 250 mm como columna, se llevó a cabo la separación por HPLC en las condiciones siguientes: inyección de volumen para un ciclo de 1,5 ml, temperatura de la columna de 30 °C, y velocidad de flujo de 10 ml/min. Se analizó cada fracción mediante LC/MS (fase móvil:

acetonitrilo-TFA al 0,1% (v/v) (27:73) que contiene TFA (0,1%), columna: Shiseido CAPCELL PAK C₁₈ UG120 3 µm 2,0 x 100 mm), y las fracciones que corresponden a cada uno de los picos de [M+H]⁺ de 954 m/z y de [M+H]⁺ de 968 m/z se combinaron y se concentraron hasta secarlos completamente para obtener 14 mg del compuesto 3 y 3,1 mg del compuesto 4.

5 Propiedades fisicoquímicas del compuesto 3

Masa molecular: 954,16

Fórmula molecular: C₄₄H₇₉N₁₁O₁₂

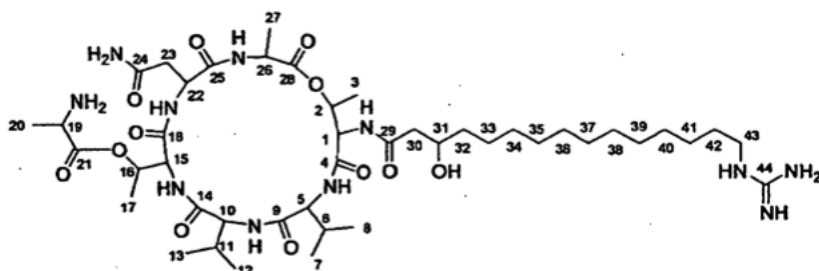
Solubilidad: fácilmente soluble en metanol, butanol, isopropanol y sulfóxido de dimetilo; e insoluble en acetato de etilo, cloroformo y hexano.

10 Hidrólisis ácida: cuando se hidroliza con ácido clorhídrico 6 N a 110 °C durante 24 horas, el compuesto 3 dio ácido aspártico, valina, treonina, alotreonina y alanina a la proporción molar de 1:2:1:1:2.

Espectro de resonancia magnética nuclear de protones: se muestra en la figura 1.

Espectro de resonancia magnética nuclear de C-13: se muestra en la tabla 15.

15 A partir de las propiedades fisicoquímicas y de los resultados del análisis espectral mencionados más arriba, se identificó la estructura química del compuesto 3 nuevo como sigue:



Propiedades fisicoquímicas del compuesto 4

Masa molecular: 968,19

Fórmula molecular: C₄₅H₈₁N₁₁O₁₂

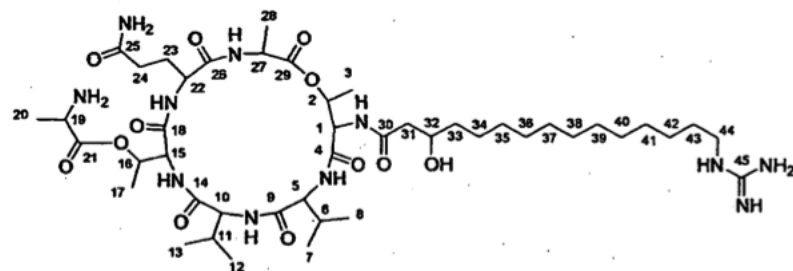
20 Solubilidad: fácilmente soluble en metanol, butanol, isopropanol y sulfóxido de dimetilo; e insoluble en acetato de etilo, cloroformo y hexano.

Hidrólisis ácida: cuando se hidrolizó con ácido clorhídrico 6 N a 110 °C durante 24 horas, el compuesto 4 dio ácido glutámico, valina, treonina, alotreonina y alanina a la proporción molar de 1:2:1:1:2.

Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (DMSO-d₆): se muestra en la figura 2.

25 Espectro de resonancia magnética nuclear de C13 (DMSO-d₆): se muestra en la tabla 15.

A partir de las propiedades fisicoquímicas y de los resultados del análisis espectral mencionados más arriba, se identificó la estructura química del compuesto 4 nuevo como sigue:



30 Tabla 15: Datos de los desplazamientos químicos en la resonancia magnética nuclear de C-13 para el compuesto 3 y para el compuesto 4

ES 2 379 178 T3

Compuesto 3			Compuesto 4		
Resto	Posición	δ_c	Resto	Posición	δ_c
Thr (1)	1	56,7	Thr(1)	1	56,3
	2	70,1		2	69,7
	3	16,5		3	16,4
	4	168,2		4	167,7
Val(1)	5	56,9	Val(1)	5	56,3
	6	31,7		6	32,2
	7	18,2		7	17,2
	8	19,1		8	19,0
	9	170,9		9	171,5
Val (2)	10	58,1	Val(2)	10	59,9
	11	29,9		11	28,7
	12	17,9		12	19,0
	13	19,2		13	19,1
	14	172,5		14	172,5
Alo-Thr(2)	15	56,3	Alo-Thr(2)	15	55,3
	16	70,8		16	70,8
	17	15,5		17	15,1
	18	168,6		18	168,4
Ala(1)	19	47,9	Ala(1)	19	47,9
	20	15,6		20	15,4
	21	169,3		21	169,4
Asn	22	50,2	Gln	22	51,9
	23	36,3		23	26,9
	24	172,3		24	32,0
	25	169,7		25	174,4
				26	170,0
Ala(2)	26	48,0	Ala(2)	27	48,5
	27	17,5		28	16,9
	28	170,5		29	170,8
GHPD	29	172,0	GHPD	30	172,1
	30	43,1		31	43,4
	31	67,5		32	67,6
	32	36,8		33	36,8
	33	25,2		34	25,3
	33-39	29,0-29,1		35-40	29,0-29,1
	40	28,6		41	28,6
	41	26,0		42	26,0
	42	28,4		43	28,4
	43	40,7		44	40,7
	44	156,7		45	156,8

GHPD: Ácido 15-guanidino-3-hidroxipentadecanoico.

Ejemplo 7 de evaluación

Evaluación de la actividad que poseen cada uno de los compuestos 3 y 4 capa de inducir resistencia a enfermedades en la planta

- 5 La actividad inductora de resistencia a enfermedades vegetales que poseen cada uno de los compuestos 3 y 4 se evaluó de la misma manera que en el ejemplo 1 de evaluación, al adoptar el método practicado en el ejemplo 1 de evaluación, a saber, el método en el cual la capacidad de respuesta inductora de células cultivadas de perejil se midió mediante la detección de la fitoalexina por fluorescencia. Los resultados se muestran en la tabla 16.

Tabla 16: Resultados de la detección de la fitoalexina

Inductor	Conjunto tratado con compuesto	Concentración (µM)	Fluorescencia relativa
Sí	Compuesto 3	0,5	222,7
	Compuesto 4	0,5	504,8
	Acibenzolar-S-metil	2,5	377,5
	Sin tratar-1	–	135,3
No	Compuesto 3	0,5	3,1
	Compuesto 4	0,5	0,7
	Acibenzolar-S-metil	2,5	0,8
	Sin tratar-2	–	1,0

10

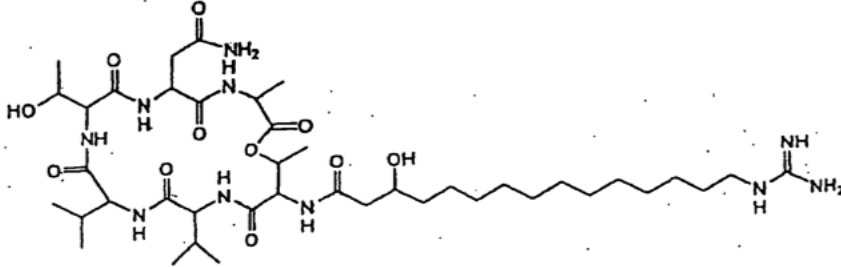
A partir de los resultados mostrados en la tabla 16, quedó patente que el compuesto 3 y el compuesto 4 mejoran la capacidad de respuesta inductora de las células cultivadas de perejil del mismo modo que la sustancia existente que tiene una actividad inductora de resistencia a enfermedades vegetales y, por lo tanto, tiene una actividad inductora de resistencia a enfermedades en la planta.

15 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

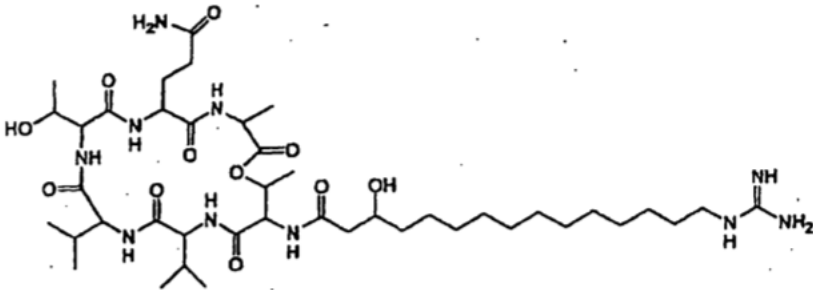
- Tal y como se describe más arriba con detalle, las cepas del género *Paenibacillus* de la presente invención, tal como las nuevas *Paenibacillus* sp. BS-0048, *Paenibacillus* sp. BS-0074, *Paenibacillus polymyxa* BS-0105 y *Paenibacillus* sp. BS-0277 son muy eficaces para controlar diferentes enfermedades vegetales y, por lo tanto, son útiles como controladores. Además, ha quedado claro que estas cepas del género *Paenibacillus*, el compuesto 1 (fusaricidina A) y el compuesto 2 (fusaricidina B), que son sustancias que se conocen bien, y los nuevos compuestos 3 y 4 tienen una actividad inductora de resistencia a enfermedades vegetales y muestran un efector controlador también sobre enfermedades vegetales que se habían considerado incontrolables. Además, se ha puesto de manifiesto que dado que estas cepas del género *Paenibacillus* y estos compuestos tienen una actividad inductora de resistencia a enfermedades en la planta, pueden proteger las plantas de infecciones por fitopatógenos.
- 20

REIVINDICACIONES

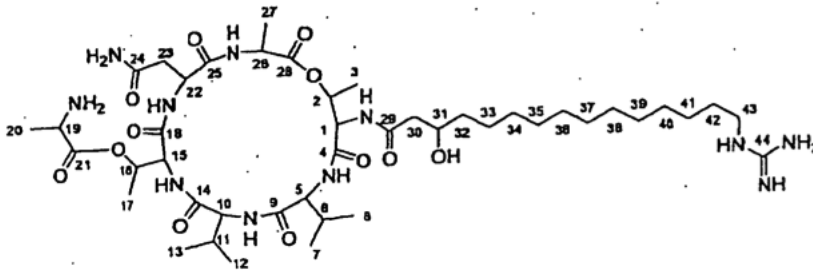
1. Uso de al menos un compuesto seleccionado entre compuesto 1 (fusaricidina A), compuesto 2 (fusaricidina B), compuesto 3 y compuesto 4 que tienen las estructuras siguientes:



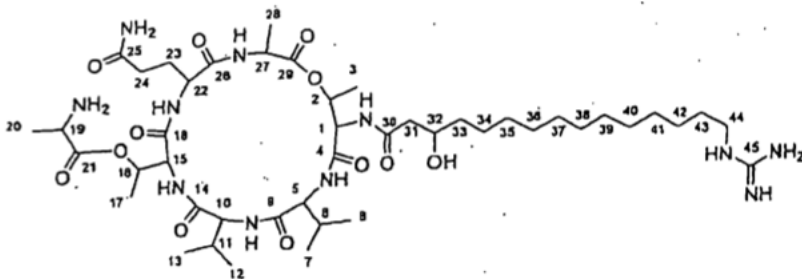
5 compuesto 1 (fusaricidina A)



compuesto 2 (fusaricidina B)



compuesto 3



10

compuesto 4

o una composición que comprende al menos un compuesto seleccionado entre los compuestos 1, 2, 3 y 4, para inducir resistencia a enfermedades en una planta.

15 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto se produce en una cepa que pertenece al género *Paenibacillus*.

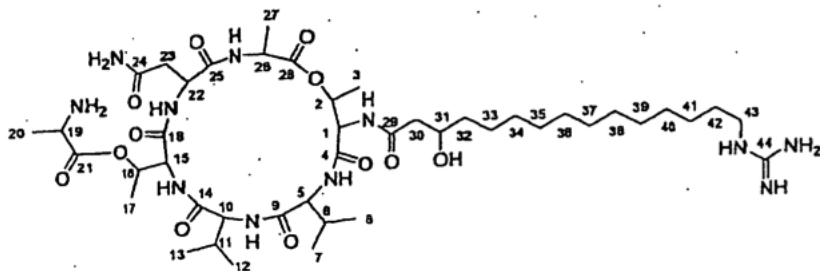
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la cepa es una cepa *Paenibacillus* sp. BS-0048, *Paenibacillus* sp. BS-0074, *Paenibacillus polymyxa* BS-0105, *Paenibacillus* sp. BS-0277.

4. Uso de una cepa que pertenece al género *Paenibacillus* para controlar la enfermedad vegetal provocada por bacterias gramnegativas, en donde dicha cepa produce al menos un compuesto seleccionado entre los compuestos 1, 2, 3 y 4 que se definen en la reivindicación 1.

5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad vegetal está provocada por bacterias gramnegativas de cepas que pertenecen al género *Pseudomonas*.

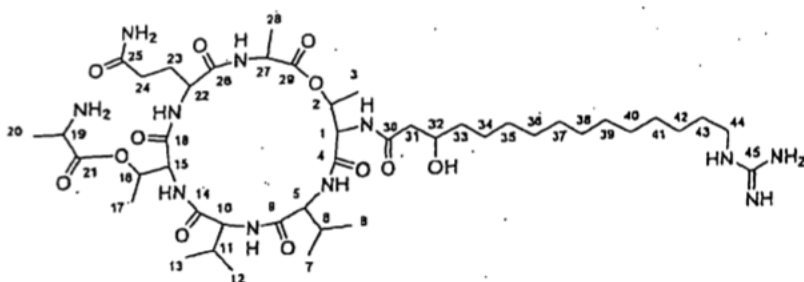
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la enfermedad vegetal es el tizón bacteriano de las plantas cucurbitáceas provocado por cepas que pertenecen al género *Pseudomonas*.

7. Compuesto de la fórmula estructural siguiente:



10 compuesto 3

o de la fórmula estructural siguiente:



compuesto 4

8. Cepa *Paenibacillus* sp. BS-0048, *Paenibacillus* sp. BS-0074, *Paenibacillus polymyxa* BS-0105, *Paenibacillus* sp. BS-0277.

9. Cepa de acuerdo con la reivindicación 8, que es capaz de controlar enfermedades vegetales provocadas por cepas que pertenecen al género *Colletotrichum* o por cepas que pertenecen al género *Glomerella*.

10. Cepa de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, que es capaz de controlar la antracnosis de las plantas cucurbitáceas o la antracnosis de la fresa.

11. Cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que es capaz de controlar enfermedades vegetales cuando se utilizan para el tratamiento de las hojas, de la zona de enraizamiento y/o de las semillas.

12. Composición que comprende una cepa que está definida en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

13. Composición de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende esporas, células vegetativas o un cultivo completo de una cepa que está definida en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

14. Composición de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, que además comprende un vehículo o adyuvante.

15. Procedimiento para controlar enfermedades vegetales, en donde dicho procedimiento comprende aplicar a una planta una cepa como la definida en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 o una composición como la definida en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14.

16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho procedimiento protege a la planta de infecciones por fitopatógenos.

17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicha cepa o composición protege a la planta frente a infecciones por fitopatógenos mediante la inducción de resistencia a enfermedades en la planta.

18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicha cepa o composición es capaz de controlar la enfermedad vegetal mediante la inducción de resistencia a enfermedades sin mostrar una actividad antimicrobiana directa.

FIG. 1

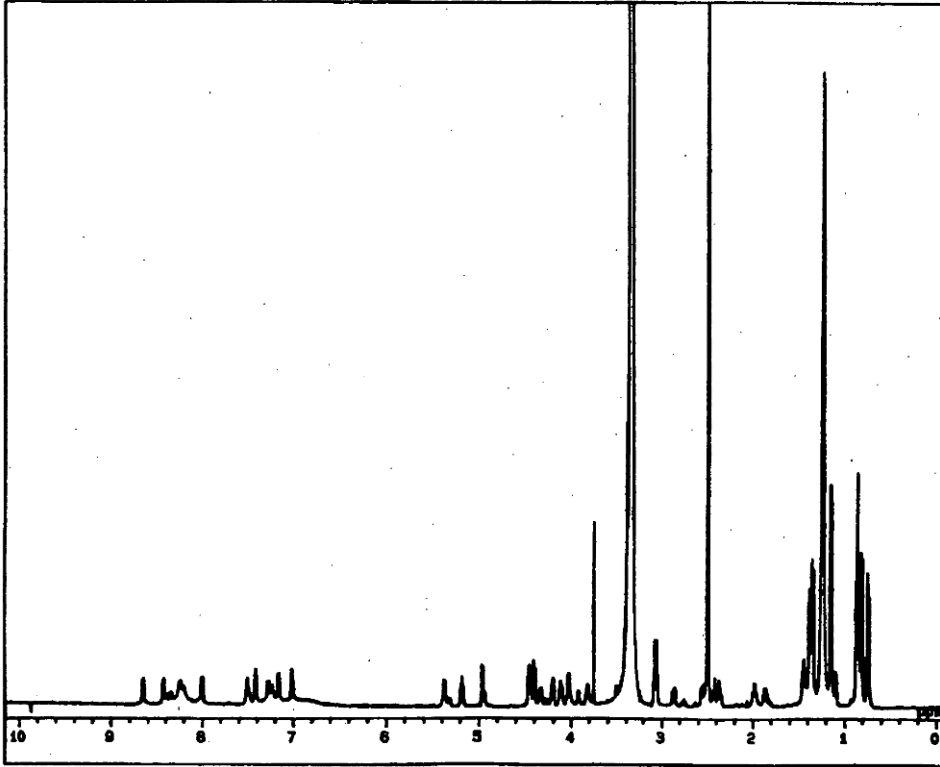


FIG. 2

