

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 584**

51 Int. Cl.:  
**A01N 63/00** (2006.01)  
**A01P 3/00** (2006.01)  
**A01P 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10163792 .4**  
96 Fecha de presentación: **25.05.2010**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2255660**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2010**

54 Título: **Agente de biocontrol contra enfermedades transmitidas por el suelo**

30 Prioridad:  
27.05.2009 CN 200910026866  
11.12.2009 WO PCT/CN2009/075496

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
29.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
29.05.2012

73 Titular/es:  
**Nau Biogenic Pesticides R&D Co., Ltd**  
**No. 6 Tongwei Road**  
**Nanjing Jiangsu 210095 y**  
**Nanjing Agricultural University**

72 Inventor/es:  
**Guo, Jianhua;**  
**Liu, Hongxia y**  
**Li, Shimo**

74 Agente/Representante:  
**Arias Sanz, Juan**

ES 2 381 584 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

Agente de biocontrol contra enfermedades transmitidas por el suelo.

**Campo de la invención**

5 La presente invención pertenece al campo técnico del control de enfermedades de cultivos, más particularmente, se refiere a combinaciones de agentes microbianos compuestos de biocontrol inocuos que pueden prevenir y curar una pluralidad de enfermedades de vegetales transmitidas por el suelo.

**Antecedentes de la invención**

10 Los patógenos de plantas transmitidos por el suelo son habitualmente habitantes del suelo, tales como *Ralstonia solanacearum* que provoca marchitamiento por *Ralstonia* de cultivos de solanáceas, *Fusarium oxysporium* y *Verticillium dahliae* que provocan una variedad de enfermedades de enanismo amarillo y marchitamiento de plantas, *Rhizoctonia solani* Kuhn que provoca tizón de la vaina del arroz, así como *Meloidogyne spp.* que está suponiendo daños más graves en todas partes en los últimos años.

15 El marchitamiento por *Ralstonia* de cultivos de solanáceas es una enfermedad global, y las bacterias patógenas pueden infectar a más de 50 variedades de 200 clases de plantas, dando como resultado pérdidas económicas globales de hasta 12 mil millones de dólares estadounidenses; *Phytophthora capsicum* provoca grandes pérdidas en la producción vegetal en China durante todo el año; el nematodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne spp.*) infecta a vegetales protegidos, conduciendo a la reducción del rendimiento de los huéspedes en un 15-25% cada año, algunas veces de más del 70%, lo que restringe gravemente la producción y exportación de vegetales. Durante la producción, estas enfermedades tienden a producirse simultáneamente, por ejemplo, la enfermedad del nematodo del nudo de la raíz, el marchitamiento bacteriano y el marchitamiento fúngico se producen a menudo en invernaderos de tomates simultáneamente, formando así una infección compuesta y dando como resultado pérdidas muy graves.

20 El área de cultivo y la producción de plátanos es la cuarta en el ranking de todas las frutas en China. El marchitamiento por *Fusarium* del plátano es una enfermedad destructiva del haz vascular transmitida por el suelo, y el patógeno se propaga rápidamente, por tanto es muy difícil que se cure. La enfermedad está volviéndose cada vez más grave en los últimos años en China, y su tasa de incidencia es del 10% al 40%, incluso de hasta el 90%.

25 El tizón de la vaina del arroz es una enfermedad global grave que influye en la producción de arroz, y es también una de las tres principales enfermedades en China. Debido a la fuerte capacidad saprofitica y al amplio espectro de huéspedes de *Rhizoctonia solani*, especialmente la promoción de variedades de arroz de alta calidad y la aplicación de tecnología de plantación cercana en el campo de alta productividad, la enfermedad está volviéndose cada vez más grave y provoca algunas pérdidas de producción de arroz cada año. El rendimiento de arroz puede descender en un 50% en una región afectada de manera grave, lo que es una amenaza directa para el rendimiento alto y estable del arroz. La resistencia al tizón de la vaina varía en diferentes variedades de arroz, pero todavía no se ha encontrado una variedad inmune y altamente resistente.

30 Estas enfermedades transmitidas por el suelo se caracterizan por un amplio espectro de huéspedes, una fuerte resistencia al estrés y una erradicación difícil, y la prevención y el control de la infección compleja es particularmente difícil. En la producción, a menudo no hay ni buenos cultivos resistentes a la enfermedad ni agentes de control químicos eficaces, mientras que la aplicación excesiva de pesticidas conlleva una serie de problemas sociales y ecológicos, tales como resistencia generada por plagas y malas hierbas, daño directo sobre organismos no diana, la contaminación del suelo, el agua y la atmósfera, efectos de bioacumulación sobre la salud humana y restricciones de comercio internacional sobre residuos de pesticidas en productos agrícolas. Ya en 1992, la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Medio Ambiente y Desarrollo (UNCED) solicitaba que "la comercialización y el uso de pesticidas químicos debe controlarse a escala global", y la humanidad ha llegado al consenso de que no podemos depender en exceso de los pesticidas químicos. Con el desarrollo de la economía y la mejora del nivel de vida de las personas, la gente presta cada vez más atención a la seguridad alimentaria, y los vegetales verdes y los productos de agricultura orgánica están recibiendo el favor de la gente.

35 Los vegetales verdes ("libres de contaminación") ya se han convertido en la corriente dominante de la producción vegetal mundial. China comenzó a realizar investigación y producción de vegetales libres de contaminación desde 1982, cuando se convocó una conferencia de control biológico nacional, y la provincia de JiangSu propuso el reemplazo de pesticidas químicos por el control biológico por primera vez en la conferencia. En 1983, con el apoyo enérgico de la Estación Nacional de Protección de Plantas, veintitrés provincias o municipios llevaron a cabo investigación, demostración y promoción de vegetales verdes. Las necesidades sociales de alimentación sana y segura promueven la investigación sobre la aplicación de métodos libres de contaminación para controlar plagas. A través de los siguientes mecanismos, tales como competición por el espacio y nutrición, secreción directa de enzimas extracelulares con degradación, producción de antibióticos para inhibir patógenos e inducción de resistencia de plantas, la cepa de biocontrol no sólo puede reducir la contaminación medioambiental provocada por el uso de pesticidas químicos y mejorar el valor agrícola, sino que también puede mejorar el entorno microecológico del suelo y suprimir poblaciones de plagas, por lo que es beneficiosa para la producción sostenible de cultivos y

proporciona una fuerte protección de la producción de vegetales verdes en China.

A lo largo de varios años de práctica, se ha explorado un conjunto de técnicas integradas para el control de plagas y enfermedades y la reducción de la contaminación por pesticidas para producir vegetales verdes, y también se han desarrollado varios fungicidas biológicos, tales como estreptomycin agrícola y jinggangmicina, en las que la primera puede usarse para preparar una disolución de 200 mg/l para controlar la podredumbre blanda de vegetales, el marchitamiento bacteriano, y la última se usa para preparar una disolución de 1000-1500 veces de control de antracnosa de vegetales, mildiú. Sin embargo, todavía no hay ningún agente de biocontrol que pueda controlar simultáneamente una pluralidad de enfermedades transmitidas por el suelo en la actualidad tales como las de hortalizas, plátanos, arroz y otros cultivos.

En la técnica anterior, según el método en la patente para el fluido conservante de bacterias del presente laboratorio (n.º de publicación: CN1358838, fecha de publicación: 17 de julio de 2002), puede almacenarse biomasa durante de 2 a 3 años a temperatura ambiente.

Por tanto, es necesario desarrollar nuevos agentes para el control de enfermedades de vegetales transmitidas por el suelo que superen todos o parte de los problemas asociados con productos conocidos tales como la grave contaminación y el excesivo coste provocados por pesticidas químicos o el hecho de que no existan agentes de biocontrol de alta eficacia contra una variedad de enfermedades transmitidas por el suelo.

### Breve descripción de la invención

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente nuevos agentes microbianos de biocontrol compuestos que tienen alta eficacia como agentes antimicrobianos en una variedad de productos tales como hortalizas, frutas (por ejemplo, plátanos), cereales (por ejemplo, arroz) o similares. Además, los agentes de la presente invención son útiles en la prevención y el tratamiento de una variedad de enfermedades transmitidas por el suelo y por tanto eficaces contra el ataque mixto de una pluralidad de enfermedades transmitidas por el suelo que existen en el invernadero y en el campo. Al mismo tiempo, son inocuos y pueden aumentar la producción de cultivos, reduciendo de ese modo los costes.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un agente microbiano compuesto de biocontrol (en el presente documento denominado "combinación PS") que comprende:

- la cepa PX35 de *Bacillus spp.* CGMCC 1930; y
- la cepa SM21 de *Bacillus spp.* CGMCC 2058.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un agente microbiano compuesto de biocontrol (en el presente documento denominado "combinación PSX") que comprende:

- la cepa PX35 de *Bacillus sp.* CGMCC 1930;
- la cepa SM21 de *Bacillus sp.* CGMCC 2058; y
- la cepa XY21 de *Serratia sp.* CGMCC 2059.

Los documentos CN 101 273 724 y CN 101 063 093 describen una mezcla de SM21 y XY21, respectivamente la cepa PX35.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar la combinación PS o la PSX tal como se definió anteriormente que comprende las siguientes etapas:

1) inocular las cepas (PX35 y SM21 para la combinación PS; PX35, SM21 y XY21 para la combinación PSX) en disolución de cultivo PDA y cultivarlas hasta que sus valores de densidad óptica (DO) a 600 nm están dentro de aproximadamente 0,1-1;

2) añadir el líquido de siembra a la disolución de cultivo PDA, agitar, cultivar y centrifugar para obtener bacterias húmedas; y

3) mezclar bacterias húmedas y conservante bacteriano para obtener los agentes microbianos y entonces mezclar los al menos dos (para la combinación PS) o los al menos tres (para la combinación PSX) agentes microbianos para obtener la combinación de agentes microbianos de biocontrol compuestos de la invención.

En una realización preferida, las cepas se cultivan hasta que sus valores de densidad óptica (DO) a 600 nm están dentro de aproximadamente 0,5-0,8.

Los usos de la combinación PS y la PSX en la prevención y el control de enfermedades transmitidas por el suelo de diversos vegetales y cultivos representan aspectos adicionales de la presente invención.

**Breve descripción de las figuras**

Figura 1: Biocontrol de tizón por *Phytophthora* en pimiento en invernadero.

Figura 2: Estimulación del crecimiento de la combinación PSX en pimiento en invernadero.

Figura 3: Eficacia de la estimulación de crecimiento de plantas y biocontrol de la combinación PSX en el campo;

5 “” significa centro infectado en el que algunos pimientos presentaban enfermedad o se han arrancado.

Figura 4: Experimento de campo contra la enfermedad compleja en tomate en la provincia de Shangdong.

Figura 5: Experimento de campo contra el marchitamiento por *Ralstonia* en tomate en la provincia de Fujian.

Figura 6: Eficacia de biocontrol de la combinación PSX hacia la enfermedad del nematodo del nudo de la raíz en pepino en el campo (ciudad de Xuzhou en la provincia de Jiangsu).

10 Figura 7: Eficacia de biocontrol de la combinación PSX hacia la enfermedad del nematodo del nudo de la raíz en pepino en el campo (ciudad de Handan de la provincia de Hebei).

Figura 8: Eficacia de biocontrol de la combinación PSX hacia la enfermedad del nematodo del nudo de la raíz en sandía en el campo (ciudad de Huaian de la provincia de Jiangsu).

Figura 9: Eficacia de biocontrol de la combinación PSX hacia marchitamiento por *Fusarium* en invernadero.

15 Figura 10: Eficacia de biocontrol de la combinación PSX hacia marchitamiento por *Fusarium* en el campo (Dongguan, provincia de Guangdong).

Figura 11: Treinta días tras el primer tratamiento de la combinación PSX en el campo (Lujiang, provincia de Anhui).

Figura 12: Estimulación del crecimiento de plantas y eficacia de biocontrol de la combinación PSX en el momento de la cosecha en el campo (Zhenjiang, provincia de Jiangsu).

20 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a agentes de biocontrol contra enfermedades transmitidas por el suelo de cultivos que tienen efectos de control significativos en comparación con otros biobactericidas con espectro antibacteriano único. Además, son particularmente útiles para abordar el ataque mixto de enfermedades de vegetales transmitidas por el suelo. Puesto que son agentes biológicos, no presentan los problemas de contaminación acarreados por el uso de pesticidas químicos, de modo que favorecen la producción de vegetales verdes, y por tanto los agricultores pueden evitar el uso de pesticidas químicos o disminuir la dosificación de pesticidas, lo que no sólo puede ahorrar gastos a los agricultores sino que también es beneficioso para la exportación de vegetales. Al mismo tiempo, los agentes microbianos también tienen la función de aumentar la producción, aumentando así los ingresos de los agricultores.

30 Tal como se usa en el presente documento, “aproximadamente” significa una ligera variación del valor especificado, preferiblemente dentro del 10 por ciento del valor especificado. No obstante, el término “aproximadamente” puede significar una mayor tolerancia de variación dependiendo de por ejemplo la técnica experimental usada. Dichas variaciones de un valor especificado las entiende el experto y están dentro del contexto de la presente invención. Además, para proporcionar una descripción más concisa, algunas de las expresiones cuantitativas facilitadas en el presente documento no se califican con el término “aproximadamente”. Se entiende que, se use el término “aproximadamente” de manera explícita o no, cada cantidad facilitada en el presente documento pretende referirse al valor dado real, y también pretende referirse a la aproximación a tal valor dado que se deduciría razonablemente basándose en la experiencia habitual en la técnica, incluyendo equivalentes y aproximaciones debidas a las condiciones experimentales y/o de medición para tal valor dado.

40 Una “cantidad eficaz” es una cantidad suficiente para lograr resultados deseados o beneficiosos. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. En cuanto al tratamiento y la protección, una “cantidad eficaz” es la cantidad suficiente para mejorar, estabilizar, revertir, ralentizar o retrasar la progresión de los estados patológicos.

45 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una combinación de agentes microbianos compuestos de biocontrol (en el presente documento denominada “combinación PS”) que puede prevenir y controlar enfermedades transmitidas por el suelo de una variedad de vegetales, que comprende dos clases de componentes bacterianos: la cepa PX35 y la cepa SM21, siendo ambas *Bacillus spp.* y que se depositaron en el China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC), en el que, PX35 se depositó el 26 de enero de 2007 y su n.º de colección de cultivo era CGMCC N.º 1930; SM21 se depositó el 24 de mayo de 2007 y su n.º de colección de cultivo era CGMCC NO.º 2058.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una combinación de agentes microbianos de biocontrol compuestos (en el presente documento denominada “combinación PSX”) para controlar enfermedades transmitidas por el suelo de diversos cultivos, que comprende tres clases de componentes bacterianos, es decir, PX35, SM21 y XY21. Ambas cepas PX35 y SM21 pertenecen a *Bacillus spp.*, que se depositaron en el China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC), y los números de colección de PX35 y SM21 eran CGMCC N.º 1930 y CGMCC n.º 2058, respectivamente. La cepa XY21 pertenece a *Serratia sp.*, y se depositó en el CGMCC el 24 de mayo de 2007, con el número de colección de CGMCO n.º 2059.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar la combinación PS o la PSX tal como se definió anteriormente que comprende las siguientes etapas:

- 1) inocular las cepas (PX35 y SM21 para la combinación PS; PX35, SM21 y XY21 para la combinación PSX) en disolución de cultivo PDA y cultivarlas hasta que sus valores de densidad óptica (DO) a 600 nm están dentro de aproximadamente 0,1-1;
- 2) añadir el líquido de siembra a la disolución de cultivo PDA, agitar, cultivar y centrifugar para obtener bacterias húmedas;
- 3) mezclar bacterias húmedas y conservante bacteriano para obtener el agente microbiano y entonces mezclar los dos (para la combinación PS) o los tres (para la combinación PSX) agentes microbianos para obtener la combinación de agentes microbianos de biocontrol compuestos.

El término “PDA” es la abreviatura de agar de dextrosa de patata (“*Potato Dextrose Agar*”), un medio común conocido por el experto. La disolución de cultivo PDA puede prepararse tal como sigue: se cortan 200 g de patatas (peladas o sin pelar) en trozos pequeños, se ponen en agua en ebullición y se hierven durante al menos 20 min. Entonces, se filtra la mezcla con gasa médica de cuatro capas, se añaden 20 g de sacarosa común al filtrado, se fija el volumen a 1000 ml, se ajusta el valor de pH a 7,2-7,4, y se esteriliza el agua madre a 121°C con 15 presiones atmosféricas durante 20 min.

La combinación de cepas puede mezclarse con un líquido de conservación bacteriana tal como los conocidos en la técnica, tal como por ejemplo el líquido descrito en el documento CN1358838.

En una realización preferida, el líquido de conservación bacteriana (conservante) comprende una disolución tampón, más preferiblemente una disolución de fosfato, y un tensioactivo. Por ejemplo, puede ser una disolución de tampón fosfato 0,01 mol/l y también puede contener Tween 20 0,001 mol/l (tensioactivo no iónico). La disolución de tampón fosfato 0,01 mol/l puede prepararse tal como sigue: se disuelven 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0,24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 800 ml de agua destilada, se usa HCl para ajustar el valor de pH de la disolución a 7,4 y al final se añade agua destilada para fijar el volumen a 1 l. Puede esterilizarse convenientemente en vapor a 15 lbf/in<sup>2</sup> (1034 x 105 Pa) durante al menos 20 min. y almacenarse a temperatura ambiente o 4°C en una nevera). Además, puede contener también Tween 20 0,001 mol/l (tensioactivo no iónico).

Una realización particular del método para preparar la combinación PS o la PSX tal como se definió anteriormente se describe a continuación en el presente documento:

Se inoculan las diferentes cepas (PX35 y SM21 para la combinación PS; PX35, SM21 y XY21 para la combinación PSX) en disolución de cultivo PDA y se cultivan a aproximadamente 37°C con 180 rpm durante 24 horas, respectivamente. Después de eso, se toman muestras por separado en una cabina de flujo laminar para determinar los valores de densidad óptica (DO) a 600 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis (UV1000, Shanghai techcomp scientific instrument Co. Ltd.). Durante la determinación, se usa la disolución de cultivo no inoculada para fijar el cero (como control) en el procedimiento.

Las cepas se cultivan preferiblemente hasta que todos los valores de DO están dentro de 0,1-1, más preferiblemente 0,5-0,8. Si cualquier valor de DO no se encuentra en el intervalo deseado, las cepas pueden cultivarse todavía de manera continua y el valor de DO se determinará cada tres horas hasta que todos los valores de DO estén dentro de este intervalo.

Después de eso, la disolución de bacterias simiente puede añadirse a la disolución de cultivo PDA, preferiblemente a una razón de 1:100. Se agita, se cultiva a aproximadamente 30°C con 180 rpm durante 36 horas y entonces se centrifuga a aproximadamente 4000 g durante 10 min. de modo que pueden obtenerse 13-16 g de bacterias húmedas a partir de 1000 ml de disolución de cultivo (un gramo de bacterias húmedas contiene aproximadamente 4 X 10<sup>10</sup>-10<sup>15</sup> bacterias).

Se mezclan las bacterias húmedas y el líquido de conservación bacteriana, preferiblemente a una razón de aproximadamente 1:40 (g/ml) para obtener el agente microbiano. Los dos o tres agentes microbianos (PX35 y SM21 para la combinación PS; PX35, SM21 y XY21 para la combinación PSX) se mezclan uniformemente, preferiblemente a una razón de aproximadamente 1:1 ó 1:1:1 para obtener los agentes microbianos de biocontrol compuestos PS y PSX, respectivamente. En el producto acabado, la concentración total de bacterias viables es de aproximadamente 1 x 10<sup>9</sup> ~ 1 x 10<sup>14</sup> ufc/ml. [ufc: abreviatura de “unidades formadoras de colonias”].

El agente microbiano puede almacenarse durante 2-3 años a temperatura ambiente.

El agente microbiano compuesto de biocontrol de la presente invención puede presentarse en una forma que no está particularmente limitada y puede adoptar cualquiera de las formas que puede adoptar un agente hortícola o agrícola común. El agente de control puede adoptar, por ejemplo, una formulación de polvo, un polvo humectable, una emulsión, una formulación fluida y una formulación granular. En una realización preferida, es una forma líquida que comprende las bacterias húmedas y el líquido de conservación.

Las formulaciones, composiciones o preparaciones que contienen la combinación de agentes microbianos compuestos de la presente invención, cuando sea apropiado, un adyuvantes sólido o líquido, se preparan de manera conocida, por ejemplo mediante mezclado homogéneo con extensores, por ejemplo disolventes, portadores sólidos y, cuando sea apropiado, compuestos surfactantes (tensioactivos).

Los agentes de la invención son apropiados para cualquier cultivo cultivado en invernaderos o campos. Por el término "cultivo" se entiende cualquier planta cultivada por el hombre y que tiene un valor económico.

Cultivos diana que van a protegerse dentro del alcance de la presente invención comprenden por ejemplo las siguientes especies de plantas: cereales (trigo, cebada, maíz, centeno, avena, arroz, sorgo y cultivos relacionados), remolacha (remolacha azucarera y remolacha forrajera), frutas de pepita, frutas de hueso y frutas de baya (manzanas, peras, ciruelas, melocotones, almendras, cerezas, fresas, frambuesas y moras), plantas leguminosas (judías, lentejas, guisantes, soja), plantas oleaginosas (colza, mostaza, amapola, aceitunas, girasoles, coco, plantas de aceite de ricino, granos de cacao, cacahuetes), plantas cucurbitáceas (pepino, calabazas, melones), plantas de fibras (algodón, lino, cáñamo, yute), cítricos (naranjas, limones, pomelo, mandarinas), hortalizas (espinaca, lechuga, espárrago, repollos, zanahorias, cebollas, tomates, patatas, pimentón), lauráceas (aguacate, canela, alcanfor), o plantas tales como maíz, tabaco, frutos secos, café, caña de azúcar, té, vides, lúpulo, plátanos y plantas de caucho natural, así como ornamentales (compuestas). Las composiciones también pueden ser útiles para la protección en almacenamiento de sustancias naturales que están en forma recién cosechada o procesada adicionalmente.

En una realización preferida, los cultivos se seleccionan del grupo formado por hortalizas, plátano o arroz.

El método para controlar enfermedades de plantas según la presente invención no está particularmente limitado siempre que sea un método que comprenda tratar una planta y/o suelo de cultivo de la misma con un agente de control de enfermedades de plantas de la presente invención, y puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del tipo de enfermedad de plantas y el tipo de planta aplicable de una manera similar a cuando se usan pesticidas químicos habituales. Por ejemplo, una planta puede tratarse con un agente de control de enfermedades de plantas de la presente invención mediante, por ejemplo, pulverización o aplicación directa con un agente de control de enfermedades de plantas de la presente invención. Alternativamente, el suelo donde crece la planta (suelo de cultivo de la planta) puede tratarse con un agente de control de enfermedades de plantas de la presente invención mediante, por ejemplo, mezclado, pulverización o irrigación con un agente de control de enfermedades de plantas de la presente invención. En el presente documento, cuando se trata un agente de control de enfermedades de plantas de la presente invención en el suelo de cultivo de una planta, o bien la planta puede plantarse tras haberse tratado el suelo con un agente de control de enfermedades de plantas de la presente invención, o bien el suelo puede tratarse con un agente de control de enfermedades de plantas de la presente invención tras haberse plantado la planta en el suelo.

Los agentes microbianos pueden prepararse por ejemplo en compost vertiéndose en fertilizante orgánico antes de trasplantarse o pulverizarse sobre el bancal con fertilizante orgánico antes de trasplantarse, y entonces se entierran en el suelo con el fertilizante en el proceso de preparación del suelo, o también pueden usarse en la irrigación de las raíces durante el trasplante. Tras retoñar, dicho agente puede lograr el efecto de controlar enfermedades transmitidas por el suelo a través de una variedad de mecanismos de biocontrol.

La presente invención se refiere al uso de una combinación PS de agentes microbianos compuestos de biocontrol para prevenir y controlar enfermedades transmitidas por el suelo de diversos vegetales tales como marchitamiento, tizón (enfermedad por *Phytophthora*) y nematodos del nudo de la raíz que existen en el invernadero y en el campo.

Los experimentos indican que el uso del agente microbiano compuesto PS en invernaderos muestra una eficacia (el 58~77%) contra diferentes enfermedades transmitidas por el suelo (principalmente marchitamiento bacteriano, enfermedad por *Phytophthora* y nematodo del nudo de la raíz) y su efecto de estimulación del crecimiento también puede alcanzar más del 50%, superior a agentes microbianos de especie única y agentes químicos; cuando el agente microbiano compuesto PS se aplica en campos, su eficacia contra el ataque mixto de dos o tres enfermedades transmitidas por el suelo es del 60%~86% y el rendimiento en campos con enfermedad aumenta en un 53%~81%.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una combinación PSX de agentes microbianos compuestos de biocontrol para prevenir y controlar enfermedades transmitidas por el suelo de diversos cultivos y sus componentes activos en la prevención y el control de diversas enfermedades transmitidas por el suelo en hortalizas, plátanos, arroz y otros cultivos que existen en el invernadero y en el campo.

Los experimentos mostraron que la combinación PSX puede usarse para controlar enfermedades de plantas transmitidas por el suelo que pueden producirse de manera individual o compleja, tales como los tizones, el marchitamiento por *Verticillium*, el marchitamiento bacteriano, la enfermedad del nematodo del nudo de la raíz de tomate, pimiento, pepino, calabaza de esponja, sandía y otras frutas y hortalizas, y su efecto de prevención de enfermedades era del 60-100% y el aumento de rendimiento era del 30-200%. Los efectos de prevención del marchitamiento por *Fusarium* de plátano y la enfermedad del tizón de la vaina del arroz son de más del 50%, y tienen un aumento del rendimiento del 20-80%. Además, la combinación PSX también puede mejorar el endurecimiento del suelo.

## Ejemplos

### 10 Procedimientos comunes

#### Utilización de combinaciones PS/PSX

Pueden usarse las combinaciones PS/PSX mediante el método de irrigación de las raíces, mezclado con fertilizante, etc.

#### 1. Irrigación de las raíces

15 Tras aplicarse los fertilizantes orgánicos bien compostados, se irriga el agente microbiano diluido a la raíz de la planta para el crecimiento normal de las raíces cuando se trasplantan las plantas. La cantidad del agente microbiano usado es de aproximadamente 6000 ml por mu (1 mu = 0,0667 hectáreas) (diluir el agente microbiano 200-300 veces antes de la aplicación, y la cantidad para cada siembra es de aproximadamente 100 ml). La frecuencia de utilización puede variar ligeramente, dependiendo de los periodos de crecimiento de los cultivos en diferentes regiones. Con respecto a los pepinos o pimientos, etc. en el otoño con un ciclo de crecimiento en invernadero de más de tres meses, se tratarían generalmente tres veces en total para lograr la eficacia óptima. Específicamente, los tratamientos tienen lugar cuando se trasplantan las plantas, o un mes tras el trasplante, o dos meses tras el trasplante, respectivamente. Con respecto a las plantas con un ciclo de crecimiento de 2-3 meses, los tratamientos tendrían lugar cuando se trasplantan las plantas, y un mes tras el trasplante, respectivamente, es decir, hay dos tratamientos en total.

#### 2. Mezclado con fertilizante

Diluir el agente microbiano (3000 ml por mu) 20-30 veces y entonces añadirlo al fertilizante de base (torta de soja/torta de colza/estiércol animal bien compostado, etc.). Tras mezclarse el agente microbiano con el fertilizante de base uniformemente, se esparce inmediatamente la mezcla por la tierra. Entonces se voltea la tierra y se cubre con películas de plástico durante 15 días (5-8 días para el verano, mientras que se necesitan 7-15 días para el invierno) antes del trasplante. Con respecto a los pepinos o pimientos, etc., en otoño con un ciclo de crecimiento en invernadero de más de tres meses, se tratan mediante irrigación de las raíces uno y dos meses tras el trasplante respectivamente usando el agente microbiano (6000 ml por mu) que se ha diluido 200-300 veces. Con respecto a las plantas con un ciclo de crecimiento de 2-3 meses, los tratamientos tendrían lugar cuando se trasplantan las plantas, y un mes tras el trasplante, respectivamente, es decir, hay dos tratamientos en total.

#### Utilización de pesticidas químicos como control

1. Control de la aparición de marchitamiento bacteriano, tizón por *Phytophthora* y enfermedad del nematodo del nudo de la raíz en un experimento de campo

40 La estreptomycin para uso agrícola, metalaxil-mancozeb y abamectina son tres pesticidas comunes para controlar el marchitamiento bacteriano, el tizón y la enfermedad del nematodo del nudo de la raíz en China.

La cantidad de abamectina al 2% es de 25 ml/mu, y se diluye 2000 veces para lograr la concentración de 500 ppm antes de su uso. Se pulveriza la abamectina al suelo antes de trasplantarse las plantas.

45 La cantidad de metalaxil-mancozeb al 58% es de 100 g/mu, y se diluye en 50 kg de agua hasta la concentración de 2000 ppm antes de su uso. Se pulveriza el metalaxil-mancozeb uniformemente a la raíz de las plantas antes de trasplantarse las plantas. 7 días tras el trasplante, se tratan las plantas con metalaxil-mancozeb de nuevo del mismo modo que la primera vez.

50 La cantidad de estreptomycin al 72% para uso agrícola es de 10 g/mu (12,5 ml/hoyo x 4000 hoyos), y se diluye 5000 veces para lograr la concentración de 200 ppm antes de su uso. Se pulveriza la estreptomycin para uso agrícola uniformemente a la raíz de las plantas antes de trasplantarse las plantas. 7 días tras el trasplante, se tratan las plantas con estreptomycin para uso agrícola de nuevo del mismo modo que la primera vez.

2. Control de la aparición de marchitamiento bacteriano, tizón por *Phytophthora* y enfermedad del nematodo de la raíz en un experimento de invernadero.

Tras diluirse la abamectina al 2% 5000 veces para lograr la concentración de 200 ppm, se usa en la irrigación de las

raíces con una cantidad de 100 ml/hoyo. Se pulveriza la abamectina al suelo antes de trasplantarse las plantas.

Tras diluirse el metalaxil-mancozeb al 58% 500 veces en agua, se usa en la irrigación de las raíces con una cantidad de 40 ml/maceta. Se pulveriza el metalaxil-mancozeb uniformemente a la raíz de las plantas antes de trasplantarse las plantas. 7 días tras el trasplante, se tratan las plantas de nuevo del mismo modo que la primera vez.

- 5 Tras diluirse la estreptomycinina al 72% para uso agrícola 5000 veces, se usa en la irrigación de las raíces con una cantidad de 50 ml/maceta. Se pulveriza la estreptomycinina para uso agrícola uniformemente a la raíz de las plantas antes de trasplantarse las plantas. 7 días tras el trasplante, se tratan las plantas de nuevo del mismo modo que la primera vez.

1. Experimento de invernadero para la combinación PS

- 10 Se sembraron semillas de *Capsicum* en bandejas de siembra de plántulas. El día 21 tras la siembra, se trasplantaron las plántulas. Una maceta alojaba una plántula. Cada tratamiento adoptó 24 plántulas de *Capsicum* en macetas y 3 repeticiones. El suelo era sustrato de vivero (producido por Huaian Chaimihe Substrate fertilizer Co., Ltd.) sin ningún patógeno. En el mismo momento en el que se trasplantaron las plántulas de *Capsicum*, se irrigaron 40 ml de disolución de bacterias  $10^8$  UFC/ml a cada maceta. Las condiciones de invernadero eran las siguientes: 28-32°C, humedad relativa del 40% e iluminación natural.

i) Experimento de invernadero para la prevención y cura de marchitamiento por *Ralstonia* de *Capsicum*

- 20 36 horas tras trasplantarse las plántulas de *Capsicum*, se irrigó una disolución de *Ralstonia solanacearum* JS55 de  $4 \times 10^5$  UFC/ml a una concentración de  $2 \times 10^5$  UFC/g de suelo (una maceta contenía 80 g de suelo y se irrigó con 40 ml de disolución de *Ralstonia solanacearum* JS55 de  $4 \times 10^5$  UFC/ml); se trató el control 1 con agua limpia en primer lugar y luego se irrigó con disolución de *Ralstonia solanacearum*; se trató el control 2 con 200 ppm de estreptomycinina para uso agrícola a 50 ml/plántula (producida por North China Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang) y, 36 horas después, se irrigó la disolución de *Ralstonia solanacearum* a la misma concentración que se mencionó anteriormente. El día 35 tras trasplantarse las plántulas de *Capsicum*, se realizó la estadística de la eficacia y la gravedad de la enfermedad. El índice de enfermedad del marchitamiento por *Ralstonia* se clasificó en niveles de 0-4 según Kempe y Sequeira (1983). [Gravedad de la enfermedad de marchitamiento por *Ralstonia* (DSR)] =  $[\sum (\text{número de plantas en cada nivel de enfermedad} \times \text{índice de enfermedad del marchitamiento por } Ralstonia) / (\text{número total de plantas investigadas} \times \text{índice de enfermedad máximo del marchitamiento por } Ralstonia)] \times 100\%$ .

ii) Experimento de invernadero para la prevención y cura de la enfermedad por *Phytophthora* de *Capsicum*

- 30 3 días tras trasplantarse las plántulas de *Capsicum*, se irrigaron 40 ml de suspensión de esporas de *Phytophthora* de  $5 \times 10^3$  UFC/ml que contenía  $2 \times 10^5$  esporas a cada maceta; se trató el control 1 con agua limpia durante el trasplante y 3 días más tarde se irrigó con un volumen igual de suspensión de esporas de *Phytophthora*; se trató el control 2 con 40 ml de una disolución de 600 veces de polvo humectable de metalaxil mancozeb al 58% (producido por Baoying Chemical Factory, Baoying, Jiangsu) y 3 días más tarde se irrigó con suspensión de esporas de *Phytophthora* del mismo volumen que se mencionó anteriormente. 7 días tras el trasplante de las plántulas de *Capsicum*, se repitió el tratamiento una vez. 35 días tras el trasplante, se realizó la estadística de la eficacia y la gravedad de la enfermedad. El índice de enfermedad de la enfermedad por *Phytophthora* de *Capsicum* se clasificó en niveles de 0-5 según Rajkumar *et al* (2005). [Gravedad de la enfermedad de tizón por *Phytophthora* (DSP)] =  $[\sum (\text{número de plantas en cada nivel de enfermedad} \times \text{índice de enfermedad de tizón por } Phytophthora) / (\text{número total de plantas investigadas} \times \text{índice de enfermedad máximo del tizón por } Phytophthora)] \times 100\%$ .

40 iii) Experimento de invernadero para la prevención y cura del nematodo del nudo de la raíz

- 45 48 horas tras trasplantarse las plántulas de *Capsicum*, se inocularon 2000 larvas de segundo estadio a cada maceta; se trató el control 1 con agua limpia durante el trasplante y 48 horas más tarde se inocularon los nematodos, con la misma concentración que se mencionó anteriormente; se trató el control 2 con 2000 veces abamectina al 1,8% (producida por North China Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang) a una dosis de 100 ml/planta y 48 horas más tarde se inocularon los nematodos, con la misma concentración que se mencionó anteriormente. 10 días más tarde, se repitió el tratamiento una vez. 55 días tras el trasplante, se realizó la estadística de la eficacia y la gravedad de la enfermedad. El índice de enfermedad del nematodo del nudo de la raíz se clasificó según el patrón de 10 niveles de Daulton y Nusbaum (1961). [Gravedad de la enfermedad del nematodo del nudo de la raíz (DSM)] =  $[\sum (\text{número de plantas en cada nivel de enfermedad} \times \text{índice de enfermedad del nematodo del nudo de la raíz}) / (\text{número total de plantas investigadas} \times \text{índice de enfermedad máximo del nematodo del nudo de la raíz})] \times 100\%$ .

iv) Experimento de estimulación del crecimiento

- 55 La concentración de cada suspensión de bacterias antagonistas era de  $10^8$  UFC/ml. Se plantó cada tratamiento en una bandeja de siembra de plántulas de 50 hoyos (4,8 x 4,8 x 6,0 cm). Cada tratamiento adoptó 3 repeticiones y 150 plántulas en total. El suelo era sustrato de vivero (producido por Huaian Chaimihe Substrate Fertilizer Co., Ltd.) y no contenía ningún patógeno. Las condiciones de invernadero eran las siguientes: 28-32°C, humedad relativa del 40% e iluminación natural. Tras la siembra de *Capsicum*, se irrigaron 10 ml de suspensión de bacterias antagonistas a

cada hoyo una vez. Se irrigó cada hoyo de control con 10 ml de agua limpia. 35 días más tarde, se realizó la estadística del peso fresco de las raíces y la parte aérea.

Peso fresco total = peso fresco de las raíces + peso fresco de la parte aérea

5 Efecto de estimulación = [(peso fresco promedio de los grupos de tratamiento - peso fresco promedio de los grupos control)/peso fresco promedio de los grupos control] x 100%.

Se usó el software SPSS13.0 para la estadística de los resultados experimentales. Se calcularon el valor promedio y la desviación estándar; se realizó análisis de varianza de un factor. Se adoptó Duncan (P = 0,05) para comprobar la significación de la diferencia.

10 El experimento de invernadero indicó que la eficacia del agente microbiano compuesto PS contra el marchitamiento por *Ralstonia* en invernaderos era del 67,40% (tabla 1) y que contra la enfermedad por *Phytophthora* de *Capsicum* era del 77,32% (tabla 2) y que contra el nematodo del nudo de la raíz alcanzó el 58,59% (tabla 3); y pudo estimular el crecimiento de las plantas y el peso fresco de las plántulas de *Capsicum* aumentó en un 52,80% (tabla 4).

Tabla 1. Experimento de invernadero con agente microbiano compuesto PS para la prevención y cura del marchitamiento bacteriano por *Ralstonia* de *Capsicum*

Tratamiento	Incidencia (%)	Eficacia (%)
PX35+SM21	29,74±1,20d	67,40
SM21	36,98±1,36cd	59,47
PX35	49,61±1,69c	45,62
Control 1*	62,71±0,74b	31,26
Control 2**	91,23±1,12a	-

\*Control 1: Irrigar las raíces con 200 ppm de estreptomicina para uso agrícola

\*\*Control 2: Tratar con agua limpia

15

Tabla 2. Experimento de invernadero con agente microbiano compuesto PS para la prevención y cura de la enfermedad por *Phytophthora* de *Capsicum*

Tratamiento	Incidencia (%)	Eficacia (%)
PX35+SM21	19,19±0,73d	77,32
PX35	22,42±0,54c	73,50
SM21	29,77±1,14b	64,81
Control 1*	29,18±1,35b	65,51
Control 2**	84,60±0,88a	-

\*Control 1: Irrigar con disolución de 500 veces de polvo humectable de metalaxil mancozeb al 58% una vez y 5 días más tarde pulverizar una vez

\*\*Control 2: Agua limpia

20

Tabla 3. Experimento de invernadero con agente microbiano compuesto PS para la prevención y cura del nematodo del nudo de la raíz de *Capsicum*

Tratamiento	Incidencia (%)	Eficacia (%)
PX35+SM21	36,98±0,41d	58,59
PX35	42,68±0,73cd	52,21

Control 1*	57,82±0,64bc	35,26
SM21	62,70±0,80b	29,79
Control 2**	89,31±1,01a	-

\*Control 1: Irrigar las raíces con 50 ppm de avermecti dos veces en un intervalo de 10 días

\*\*Control 2: Agua limpia

Tabla 4. Experimento de invernadero sobre el agente microbiano compuesto PS para la estimulación del crecimiento de *Capsicum*

Tratamiento	Peso fresco (g)	Aumento de peso fresco (%)
PX35+SM21	3,287±0,11c	52,90
PX35	2,910±0,17b	35,36
SM21	2,798±0,03b	30,14
Control 1*	2,150±0,14a	-

\*Control 1: Agua limpia

## 5 2. Experimento de campo para la combinación PS

Los experimentos de campo para determinar la eficacia del agente microbiano compuesto PS contra una pluralidad de enfermedades transmitidas por el suelo se realizaron en Huaian de Jiangsu y Gaocheng de Hebei en 2007 y 2008. El agente microbiano puede pulverizarse antes del trasplante del cultivo, y también puede usarse tras convertirlo en compost, o puede diluirse y entonces irrigarse a las raíces durante el trasplante. El resultado de la investigación de enfermedades fue el mismo que el del experimento de invernadero.

Gravedad de la enfermedad total = gravedad de la enfermedad del marchitamiento por *Ralstonia* + gravedad de la enfermedad por *Phytophthora* + gravedad de la enfermedad del nematodo del nudo de la raíz

Eficacia de prevención y cura = [(gravedad de la enfermedad total de los grupos control - gravedad de la enfermedad total de los grupos de tratamiento)/gravedad de la enfermedad total de los grupos de tratamiento] x 100%

Efecto de aumento del rendimiento = [(rendimiento promedio de los grupos de tratamiento - rendimiento promedio de los grupos control)/rendimiento promedio de los grupos control] x 100%.

Los resultados de los experimentos de campo indican que la combinación PS mostró un efecto muy bueno de resistencia a la enfermedad y aumento del rendimiento en los campos con infección compleja de una pluralidad de enfermedades transmitidas por el suelo. Los resultados de los experimentos en las dos zonas en dos años indican que la eficacia contra enfermedades mixtas (enfermedad por *Phytophthora* y nematodo del nudo de la raíz) de *Capsicum* primaveral en Gaocheng de Hebei alcanzó el 61,77% y que el rendimiento aumentó en un 55% (tabla 5); y la eficacia contra estas dos enfermedades de *Capsicum* otoñal era del 77,07% y el rendimiento aumentó en un 79,15% (tabla 6), que eran mejores que la eficacia de pesticidas químicos y agente microbiano individual. En Huaian de Jiangsu, la eficacia contra enfermedades mixtas (marchitamiento por bacterias, enfermedad por *Phytophthora* y nematodo del nudo de la raíz) de *Capsicum* primaveral era del 67,33% y el rendimiento aumentó en un 54% (tabla 7); la eficacia contra estas enfermedades en el otoño era del 86,27%, lo que es estable, y el aumento del rendimiento promedio era del 81,39% (tabla 8), lo que era muy superior a la combinación agente microbiano individual y pesticida químico.

Tabla 5. Influencia de la combinación PS y pesticida químico sobre el rendimiento y la eficacia contra enfermedades transmitidas por el suelo de *Capsicum* en Gaocheng de Hebei en el otoño de 2007

Tratamiento	Rendimiento (Kg/parcela)	Tasa de aumento del rendimiento (%)	Incidencia de enfermedades mixtas (%)	Eficacia (%)
PX35+SM21	21,02±1,98c	55,37	7,40±1,66c	61,77
PX35	19,46±1,79bc	43,84	8,97±1,99c	53,65

SM21	18,32±2,32b	35,39	10,02±2,84bc	48,24
Metalaxil mancozeb + Avermecti	17,22±2,04b	27,26	11,98±2,43b	38,12
Control	13,53±1,98a	-	19,36±255a	-

Tabla 6. Influencia de la combinación PS y pesticida químico sobre el rendimiento y la eficacia contra enfermedades transmitidas por el suelo de *Capsicum* en Gaocheng de Hebei en la primavera de 2008

Tratamiento	Rendimiento (Kg/parcela)	Tasa de aumento del rendimiento (%)	Incidencia de enfermedades mixtas (%)	Eficacia (%)
PX35+SM21	20,37±2,64c	79,15	6,13±2,14d	77,07
PX35	16,98±2,33bc	49,38	10,67±1,95c	60,09
SM21	15,91±2,58b	39,97	11,95±2,58c	55,30
Metalaxil mancozeb + Avermecti	15,26±2,58b	34,20	15,39±2,45b	42,46
Control	11,37±2,91a	-	26,74±2,59a	-

5 Tabla 7. Influencia de la combinación PS y pesticida químico sobre el rendimiento y la eficacia contra enfermedades transmitidas por el suelo de *Capsicum* en Huaian de Jiangsu en el otoño de 2007

Tratamiento	Rendimiento (Kg/parcela)	Tasa de aumento del rendimiento (%)	Incidencia de enfermedades mixtas (%)	Eficacia (%)
PX35+SM21	22,07±2,13d	53,47	6,06±1,48c	67,33
PX35	20,22±1,69c	40,61	8,52±1,81bc	54,07
SM21	19,07±1,69bc	32,59	9,65±2,43bc	47,94
Estreptomicina para uso agrícola + metalaxil mancozeb + Avermecti	17,95±2,69b	24,83	11,46±1,64b	38,19
Control	14,38±2,40a	-	18,54±2,94a	-

Tabla 8. Influencia de la combinación PS y pesticida químico sobre el rendimiento y la eficacia contra enfermedades transmitidas por el suelo de *Capsicum* en Huaian de Jiangsu en la primavera de 2008

Tratamiento	Rendimiento (Kg/parcela)	Tasa de aumento del rendimiento (%)	Incidencia de enfermedades mixtas (%)	Eficacia (%)
PX35+SM21	22,98±1,79d	81,39	3,39±2,33d	86,27
PX35	20,64±2,04c	62,89	8,41±1,78c	65,92
SM21	19,06±1,98c	50,41	10,39±2,33bc	57,90
Estreptomicina para uso agrícola + metalaxil mancozeb + Avermecti	16,81±2,43b	32,70	13,85±2,72b	43,92

Control	12,67±2,83a	-	24,69±3,80a	-
---------	-------------	---	-------------	---

En las tablas 1-8, la significación de la diferencia de los datos (indicada con las letras a-d) se comprueba con el software estadístico SPSS al nivel de la prueba LSD (P = 0,05).

Todos los tratamientos adoptan 4 repeticiones. Los datos en las tablas 1-8 son los valores promedio y las desviaciones estándar de cuatro repeticiones.

3. Eficacia de biocontrol de la familia PSX en el control de la aparición compleja de marchitamiento bacteriano, tizón por *Phytophthora* y enfermedad del nematodo del nudo de la raíz en invernadero

5 En el experimento de invernadero, se comparó la eficacia de biocontrol de la familia PSX que incluía 3 cepas individuales PX35, SM21 y XY21; 3 combinaciones de dos cepas y la combinación PSX. Se usaron 4 controles. El control 1 se trató sólo con agua fresca; los controles 2, 3 y 4 se trataron respectivamente con estreptomices, metalaxil-mancozeb y abamectina (los tres pesticidas son pesticidas comunes para controlar el marchitamiento bacteriano, el tizón y la enfermedad del nematodo del nudo de la raíz en China). Los resultados se muestran en la tabla 9 y la figura 1.

10 Tabla 9. Eficacia de biocontrol de la familia PSX en el control de la aparición compleja de marchitamiento bacteriano, tizón por *Phytophthora* y enfermedad del nematodo del nudo de la raíz en invernadero

Tratamientos	Gravedad de la enfermedad* (%)			Eficacia de biocontrol (%)		
	Marchitamiento por <i>Ralstonia</i>	Tizón por <i>Phytophthora</i>	Enfermedad del nematodo del nudo de la raíz	Marchitamiento por <i>Ralstonia</i>	Tizón por <i>Phytophthora</i>	Enfermedad del nematodo del nudo de la raíz
PX35	18,08±2,4	30,10±3,6 <sup>d</sup>	17,88±1,5 <sup>e</sup>	64,39±2,2	80,48±4,3 <sup>b</sup>	65,04±3,1 <sup>b</sup>
SM21	27,60±4,9 <sup>cd</sup>	44,73±4,5 <sup>c</sup>	31,2±3,2 <sup>b</sup>	50,3±2,7 <sup>f</sup>	63,36±3,6 <sup>e</sup>	41,65±2,7 <sup>e</sup>
XY21	32,50±5,1 <sup>c</sup>	60,30±4,6 <sup>b</sup>	28,94±2,6 <sup>b c</sup>	80,2±3,2 <sup>c</sup>	53,45±2,7 <sup>g</sup>	21,33±1,6 <sup>g</sup>
PX35+SM21	15,23±2,3 <sup>e</sup>	30,93±3,8 <sup>d</sup>	23,925±2,2 <sup>cd</sup>	75,27±3,2 <sup>d</sup>	79,83±2,7 <sup>b</sup>	65,53±4,7 <sup>b</sup>
PX35+XY21	15,35±2,6 <sup>e</sup>	29,30±2,6 <sup>d</sup>	20,88±1,5 <sup>de</sup>	82,85±4,7 <sup>b</sup>	71,79±4,4 <sup>c</sup>	51,01±2,5 <sup>c</sup>
SM21+XY21	21,95±4,1 <sup>de</sup>	41,35±2,6 <sup>c</sup>	27,43±2,1 <sup>bc</sup>	82,71±4,8 <sup>b</sup>	57,66±2,4 <sup>f</sup>	36,05±2,4 <sup>f</sup>
PX35 + SM21 + XY21	6,88±2,5 <sup>t</sup>	13,94±1,5 <sup>e</sup>	11,98±1,0 <sup>f</sup>	92,25±3,9 <sup>a</sup>	85,94±5,1 <sup>a</sup>	73,45±4,8 <sup>a</sup>
Control 1	91,23±3,9 <sup>a</sup>	76,65±3,5 <sup>a</sup>	88,65±1,0 <sup>a</sup>	-	-	-
Control 2	53,53±5,5 <sup>b</sup>	-	-	39,71±2,5 <sup>g</sup>	-	--
Control 3	-	40,35±2,7 <sup>c</sup>	-	-	67,62±3,8 <sup>d</sup>	-
Control 4	-	-	30,58±2,7 <sup>b</sup>	-	-	47,36±3,3 <sup>d</sup>

\*Se calculó la gravedad de la enfermedad según el índice de enfermedad del marchitamiento bacteriano, el tizón por *Phytophthora*, la enfermedad del nematodo del nudo de la raíz. Los valores son medias ± D.E., seguidos por las letras diferentes dentro de una columna son significativamente diferentes tal como se determina mediante la prueba de Duncan (P = 0,05).

4. Estimulación del crecimiento de la familia PSX en el pimiento en invernadero

5 La tabla 3 muestra la eficacia de estimulación del crecimiento de plantas de cada cepa bacteriana individual, cada combinación de dos cepas de la familia PSX y la combinación PSX. La combinación PSX mostró los mayores efectos sobre la estimulación del crecimiento de plantas, la biomasa aumentó en un 64,67%; mientras que los otros tratamientos en la familia PSX tuvieron aumentos de biomasa del 4,85-21,14%. Los aumentos de tanto el peso fresco de las raíces como el peso fresco de los brotes (96,19% y 59,73%) provocados por la combinación PSX eran significativamente superiores a los homólogos (11,74-50,33% y 3,79-16,63%) provocados por los otros tratamientos en la familia PSX.

Tabla 10. Eficacia de estimulación del crecimiento de la familia PSX en pimiento en el invernadero

Tratamiento	Peso fresco de las raíces* (g/planta)	Aumento de peso fresco de las raíces (%)	Peso fresco de los brotes* (g/planta)	Aumento de peso fresco de los brotes (%)	Peso fresco total* (g/planta)	Aumento de biomasa (%)
PX35	0,401±0,0 <sup>c</sup>	17,68±2,5 <sup>e</sup>	2,496±0,0 <sup>bc</sup>	12,94±2,01 <sup>cd</sup>	2,897±0,1 <sup>bc</sup>	13,58±1,2 <sup>e</sup>
SM21	0,482±0,0 <sup>b</sup>	41,67±2,3 <sup>c</sup>	2,505±0,2 <sup>bc</sup>	13,35±1,56 <sup>c</sup>	2,987±0,2 <sup>bc</sup>	17,14±2,2 <sup>c</sup>
XY21	0,381±0,0 <sup>cd</sup>	11,74±1,2 <sup>g</sup>	2,293±0,1 <sup>bc</sup>	3,79±0,49 <sup>e</sup>	2,674±0,2 <sup>cd</sup>	4,85±0,9 <sup>f</sup>
PX35+SM21	0,512±0,0 <sup>b</sup>	50,33±2,8 <sup>b</sup>	2,577±0,1 <sup>b</sup>	16,63±1,75 <sup>b</sup>	3,089±0,2 <sup>b</sup>	21,14±2,15 <sup>b</sup>
PX35+XY21	0,393±0,0 <sup>cd</sup>	15,26±1,8 <sup>f</sup>	2,496±0,2 <sup>bc</sup>	12,98±1,55 <sup>cd</sup>	2,889±0,2 <sup>bc</sup>	13,28±1,8 <sup>e</sup>
SM21+XY21	0,466±0,1 <sup>b</sup>	36,83±1,9 <sup>d</sup>	2,471±0,1 <sup>bc</sup>	11,81±1,74 <sup>d</sup>	2,937±0,2 <sup>bc</sup>	15,16±2,2 <sup>d</sup>
PX35+SM21+XY21	0,669±0,0 <sup>a</sup>	96,19±5,1 <sup>a</sup>	3,530±0,2 <sup>a</sup>	59,73±3,91 <sup>a</sup>	4,199±0,3 <sup>a</sup>	64,67±4,8 <sup>a</sup>
Control**	0,341±0,0 <sup>d</sup>	0,00	2,210±0,1 <sup>c</sup>	0,00	2,550±0,1 <sup>d</sup>	0,00

\* Los datos mostrados eran el promedio de tres repeticiones de este experimento. Los valores son medias ± D.E., seguidos por las letras diferentes dentro de una columna son significativamente diferentes tal como se determina mediante la prueba LSD (P = 0,05). Los datos se expresaron como el promedio de tres repeticiones.

\*\* Medios de control en los que las plántulas se trataron con agua fresca.

10

5. Eficacia de biocontrol de la combinación PSX contra enfermedades complejas en pimiento en el campo

15 Las enfermedades complejas, incluyendo marchitamiento bacteriano, tizón por *Phytophthora* y enfermedad del nematodo del nudo de la raíz se producían regularmente en el distrito de Huaian de la provincia de Shandong y en distritos de Linyi de la provincia de Jiangsu. Noventa días tras el tratamiento de la combinación PSX en distritos de Huaian, la combinación PSX logró una eficacia de biocontrol total del 79,05% y un aumento del rendimiento del 149,2%, mientras que los pesticidas químicos mostraron una eficacia de biocontrol total del 52,55% y un aumento del rendimiento del 80,0% (tabla 11). Se obtuvieron resultados similares en distritos de Linyi de la provincia de Shandong.

20 Tabla 11. Eficacia de biocontrol contra la enfermedad compleja y aumento del rendimiento de pimiento 90 días tras el tratamiento con PSX en el campo de la ciudad de Huaian, provincia de Jiangsu

Tratamientos	Gravedad de la enfermedad (%)*			Eficacia de biocontrol total (%)*	Rendimiento (g/planta)*	Aumento del rendimiento (%)*
	Marchitamiento por <i>Ralstonia</i>	Tizón por <i>Phytophthora</i>	Enfermedad del nematodo del nudo de la raíz			
PSX	2,81±0,14 <sup>c</sup>	2,29±0,32 <sup>c</sup>	2,26±0,25 <sup>c</sup>	79,05±6,02 <sup>a</sup>	309,5±112,5 <sup>a</sup>	149,2±7,3 <sup>a</sup>
Control 1**	12,44±2,23 <sup>a</sup>	14,67±1,15 <sup>a</sup>	6,12±0,78 <sup>a</sup>	-	124,2±71,6 <sup>c</sup>	-
Control 2**	4,55±0,62 <sup>b</sup>	8,47±1,54 <sup>b</sup>	3,75±0,19 <sup>b</sup>	52,55±7,11 <sup>b</sup>	223,5±88,3 <sup>b</sup>	80,0±4,5 <sup>b</sup>

\* Los valores de medias  $\pm$  D.E. Los marcados con diferentes letras dentro de una columna son significativamente diferentes tal como se determina mediante la prueba de Duncan ( $P = 0,05$ ). Este experimento se repitió 3 veces.

\*\* Control 1 en el que las plántulas se trataron sólo con agua. En el control 2, las raíces de las plántulas se trataron conjuntamente con estreptomices, metalaxil-mancozeb y abamectina.

6. Eficacia de biocontrol de la combinación PSX contra la enfermedad compleja

5 Usando la combinación PSX, se realizó el experimento de campo en los invernaderos de plástico en los que una enfermedad compleja que incluía marchitamiento por *Fusarium*, enfermedad del nematodo del nudo de la raíz y tizón por *Phytophthora* se ha producido durante 8 años en la provincia de Shangdong. Los resultados se muestran en la tabla 12 y la figura 4.

Tabla 12. Experimento de campo en tomate en la provincia de Shangdong (2008)

Tratamientos	Gravedad de la enfermedad (%)	Eficacia de biocontrol (%)	Rendimiento (Kg/parcela**)	Aumento del rendimiento (%)
Combinación PSX	21,5 $\pm$ 1,71 <sup>b</sup>	74,22 $\pm$ 1,01	34,43 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>	61,18 $\pm$ 0,55
Control de agua	83,4 $\pm$ 3,49 <sup>a</sup>	-	21,36 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	-

\* Las medias seguidas por las letras diferentes dentro de una columna son significativamente diferentes tal como se determina mediante la prueba LSD ( $P = 0,05$ ). Los datos representan medias de experimentos con 4 repeticiones cada uno.

\*\* Cada parcela tenía 4 m de longitud y 4 m de anchura, y se plantaron 100 plántulas de pimiento.

7. Eficacia de biocontrol de la combinación PSX contra la enfermedad compleja en pepino en el campo

10 En el campo de experimento del condado de Tongshan, ciudad de Xuzhou de la provincia de Jiangsu, ya se había cultivado pepino durante 10 años. *Meloidogyne* del nudo de la raíz se había producido de manera muy grave, y se mezclaba con otras enfermedades del nudo de la raíz de las que no se había determinado el patógeno. El agricultor planeó cultivar arroz en su lugar en 2006. Se realizó este experimento de biocontrol en 2007. El resultado se muestra en la tabla 13 y la figura 16. En otro experimento de campo en Yongnian, ciudad de Handan de la provincia de Hebei, la combinación PSX logró una eficacia de biocontrol del 86,5% hacia la enfermedad del nematodo del nudo de la raíz, y un aumento del rendimiento del 56,4%. Se muestra la diferencia de las raíces de pepino en la figura 7.

Tabla 13. Experimento de campo en pepino en la ciudad de Xuzhou de la provincia de Jiangsu (2007)

Tratamientos	Gravedad de la enfermedad (%)	Eficacia de biocontrol (%)	Rendimiento (g/planta)	Aumento del rendimiento (%)
Combinación PSX	33,3 $\pm$ 3,1 <sup>b</sup>	63,3 $\pm$ 1,01	1305,0 $\pm$ 38,7 <sup>b</sup>	198,8 $\pm$ 31,5
Control de agua	91,1 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>	-	436,7 $\pm$ 51,2 <sup>a</sup>	-

\* Las medias seguidas por la misma letra dentro de una columna no son significativamente diferentes tal como se determina mediante la prueba LSD ( $P = 0,05$ ). Los datos representan medias de experimentos con 4 repeticiones cada uno.

20 8. Eficacia de biocontrol de la combinación PSX hacia la enfermedad del nematodo del nudo de la raíz en sandía en el campo

25 La sandía es una de las frutas más populares en China y otros países. Desgraciadamente, muchos patógenos transmitidos por el suelo afectan a esta planta, algunas veces incluso destruyen todo el campo. La combinación PSX controló la enfermedad compleja transmitida por el suelo con la eficacia del 70% excepto durante los días de fuerte lluvia. La tabla 14 y la figura 8 muestran el resultado del experimento de campo que un agricultor realizó en su propio invernadero de plástico con la combinación PSX en la ciudad de Huaian de la provincia de Jiangsu.

Tabla 14. Experimento de campo en sandía en la ciudad de Huaian de la provincia de Jiangsu (2008)

Tratamientos	Gravedad de la enfermedad* (%)	Eficacia de biocontrol* (%)	Rendimiento* (kg/acre)	Aumento del rendimiento (%)
Combinación PSX	7,67±0,7 <sup>b</sup>	72,0±1,8	2733±38,7 <sup>b</sup>	41,8±31,5
Control de agua	27,35±2,3 <sup>a</sup>	-	1928±51,2 <sup>a</sup>	-

\* Las medias seguidas por las letras diferentes dentro de una columna son significativamente diferentes tal como se determina mediante la prueba LSD (P = 0,05). Los datos representan medias de experimentos con 3 repeticiones cada uno. Cada parcela era la mitad de un invernadero de plástico (50 m de longitud y 4 m de anchura, y se plantaron 100 plántulas de pepino)

#### 9. Eficacia de biocontrol de la combinación PSX para controlar el marchitamiento por *Fusarium* en plátano en invernadero

- 5 El marchitamiento del plátano provocado por *Fusarium oxysporum* se produce de manera grave en el sur de China, especialmente en la provincia de Guangdong. La combinación PSX tuvo una eficacia de biocontrol del 53,23% y un aumento de la biomasa del 27,55% en invernadero (figura 9). En el experimento de campo de 2009 en la ciudad de Zhuhai de la provincia de Guangdong, se logró una eficacia de biocontrol del 75,02% tras trasplantarse los plátanos durante 4 meses (tabla 15). En la ciudad de Dongguan, la eficacia de biocontrol era del 64,29% (figura 10). Este experimento de campo se finalizará en abril de 2010, aunque se estima que el aumento del rendimiento será de aproximadamente el 40-50% en los campos infectados y del 5-10% en los campos no infectados.

Tabla 15. Estimulación del crecimiento de plantas y biocontrol de la combinación PSX en plátano en el campo (ciudad de Zhuhai, provincia de Guangdong)\*

Tratamientos	Gravedad de la enfermedad* (%)	Eficacia de biocontrol (%)
Combinación PSX	3,47±0,01 <sup>b</sup>	75,02
Control de agua	13,89±0,08 <sup>a</sup>	-

\* Las medias seguidas por las letras diferentes dentro de una columna son significativamente diferentes tal como se determina mediante la prueba LSD (P = 0,05). Los datos representan medias de experimentos con 3 repeticiones cada uno. Cada parcela tenía 67 m<sup>2</sup> con 12 plantas de plátano de la línea "Brasil".

#### 10. Eficacia de biocontrol de la combinación PSX hacia el tizón de la vaina del arroz en el campo

- 15 El arroz es el cultivo más importante en China, y el tizón de la vaina provocada por *Rhizoctonia solani* es una de las enfermedades más graves en el arroz. Se probó la combinación PSX contra el tizón del arroz en el condado de Lujiang, ciudad de Chaohu de la provincia de Anhui, y obtuvo una eficacia de biocontrol mejor que la Jínggāngmicina que se usa ampliamente para controlar esta enfermedad en China (tabla 16, figura 11). Se lograron resultados similares en la ciudad de Zhenjiang de la provincia de Jiangsu (figura 12).

Tabla 16. Biocontrol del tizón de la vaina del arroz mediante la combinación PSX en el experimento de campo (condado de Lujiang de la provincia de Anhui)

Tratamientos	Gravedad de la enfermedad (%)			Medias ± D.E.	Eficacia de control (%)
	I	II	III		
Combinación PSX	17,50	15,30	15,67	16,49 ± 1,11 <sup>c</sup>	81,22
Jínggāngmicina (20%)	27,43	26,52	25,60	26,51 ± 0,91 <sup>b</sup>	69,81
Control de agua	89,20	88,94	85,30	87,81±2,18 <sup>a</sup>	-

**REIVINDICACIONES**

1. Combinación de agentes microbianos compuestos de biocontrol que comprende:
  - la cepa PX35 de *Bacillus spp.* CGMCC 1930; y
  - la cepa SM21 de *Bacillus spp.* CGMCC 2058.
- 5 2. Combinación de agentes microbianos compuestos de biocontrol que comprende:
  - la cepa PX35 de *Bacillus sp.* CGMCC 1930;
  - la cepa SM21 de *Bacillus sp.* CGMCC 2058; y
  - la cepa XY21 de *Serratia sp.* CGMCC 2059.
- 10 3. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que las cepas están presentes en aproximadamente la misma razón.
4. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un conservante bacteriano a una razón de aproximadamente 40:1 (g/ml) con respecto a bacterias húmedas.
5. Combinación según la reivindicación 4, en la que la concentración total de bacterias viables es de aproximadamente  $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{14}$  ufc/ml.
- 15 6. Producto en forma de compost o líquido que comprende una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 junto con un fertilizante orgánico.
7. Método para preparar una combinación según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:
  - 1) inocular las cepas PX35 y SM21 en disolución de cultivo PDA y cultivarlas hasta que sus valores de densidad óptica a 600 nm estén dentro de aproximadamente 0,1-1;
  - 20 2) añadir el líquido de siembra a la disolución de cultivo PDA, agitar, cultivar y centrifugar para obtener bacterias húmedas; y
  - 3) mezclar bacterias húmedas y conservante bacteriano para obtener los agentes microbianos y entonces mezclar los dos agentes microbianos PX35 y SM21 para obtener la combinación de agentes microbianos de biocontrol compuestos.
- 25 8. Método para preparar una combinación según la reivindicación 2, que comprende las siguientes etapas:
  - 1) inocular las cepas PX35, SM21 y XY21 en disolución de cultivo PDA y cultivarlas hasta que sus valores de densidad óptica a 600 nm estén dentro de aproximadamente 0,1-1;
  - 2) añadir el líquido de siembra a la disolución de cultivo PDA, agitar, cultivar y centrifugar para obtener bacterias húmedas; y
  - 30 3) mezclar bacterias húmedas y conservante bacteriano para obtener los agentes microbianos y entonces mezclar los tres agentes microbianos PX35, SM21 y XY21 para obtener la combinación de agentes microbianos de biocontrol compuestos.
9. Uso de una combinación según las reivindicaciones 1 ó 2, para prevenir y controlar enfermedades transmitidas por el suelo de hortalizas, frutas, cereales y otros cultivos cultivados en invernadero y en el campo.
- 35 10. Uso según reivindicación 9, en el que la enfermedad transmitida por el suelo se selecciona del grupo que consiste en marchitamiento, tizón y nematodos del nudo de la raíz.
11. Uso según la reivindicación 9, en el que dichos cultivos se seleccionan del grupo que consiste en hortalizas, plátanos y arroz.
- 40 12. Método para controlar una enfermedad de plantas, en el que se aplica una combinación según las reivindicaciones 1 ó 2 a una planta y/o suelo de cultivo de la planta.

**FIGURA 1**



**FIGURA 2**

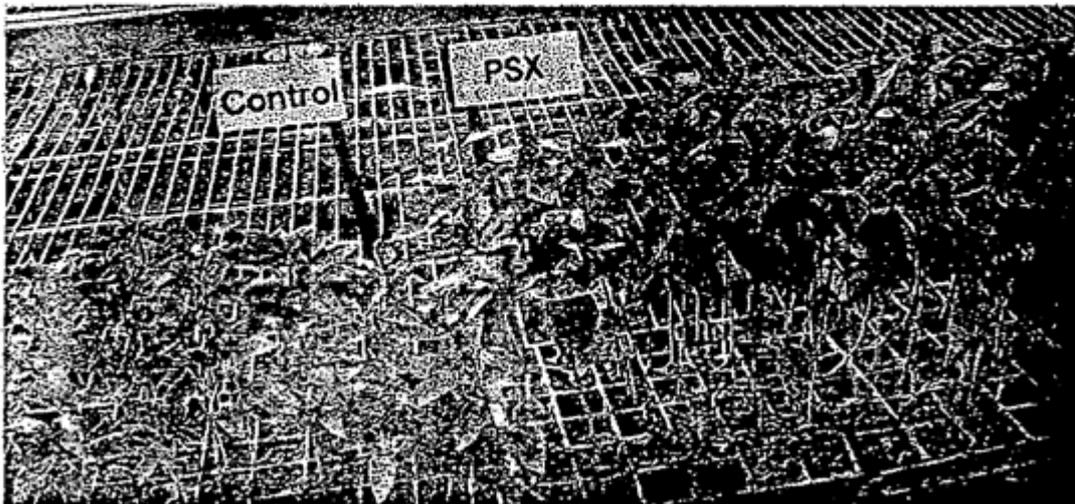


FIGURA 3

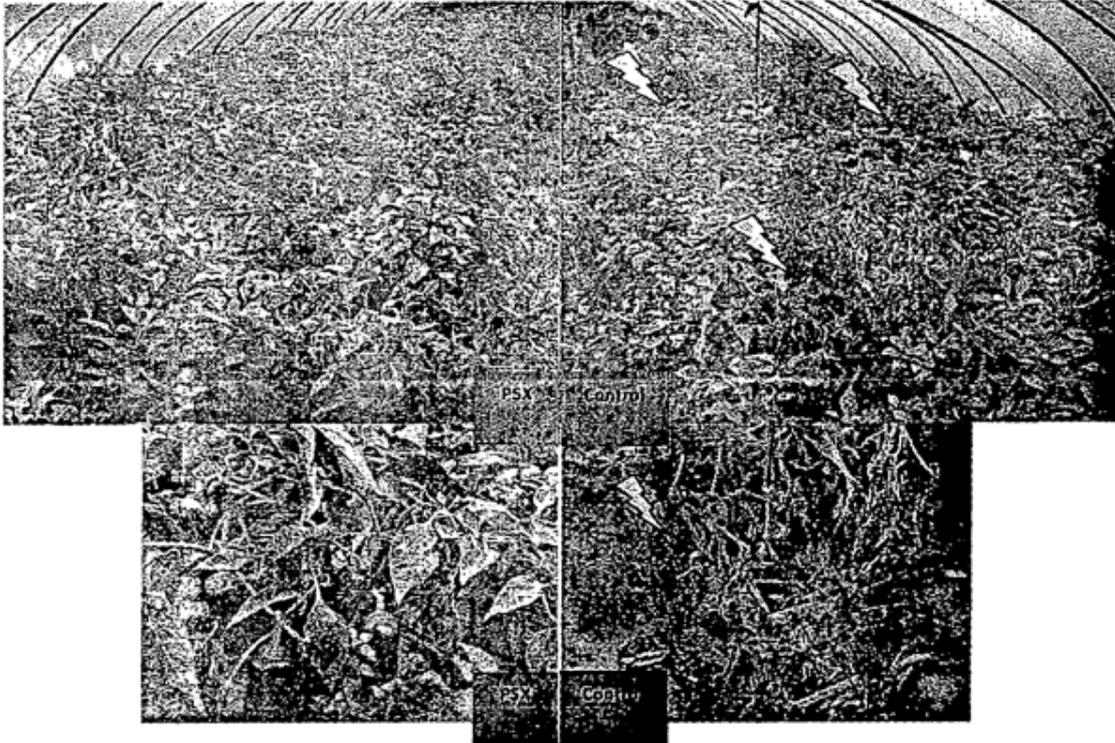


FIGURA 4



FIGURA 5

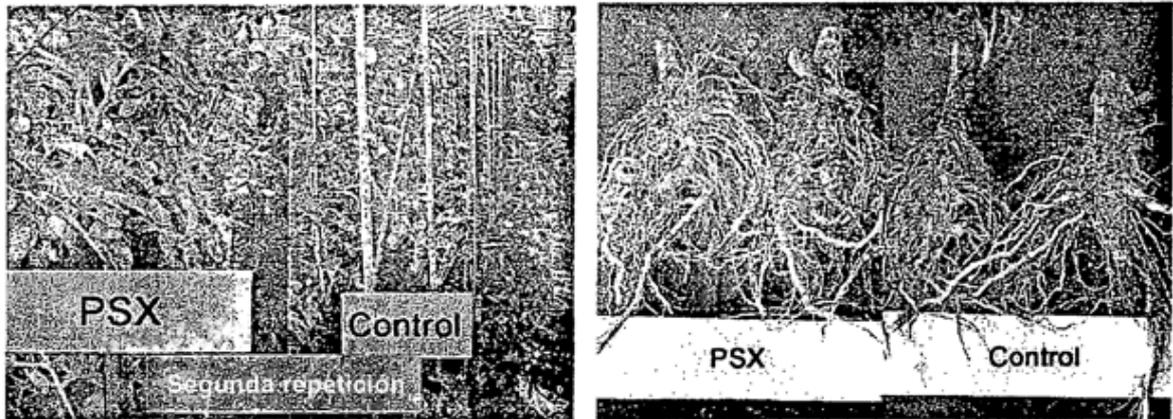
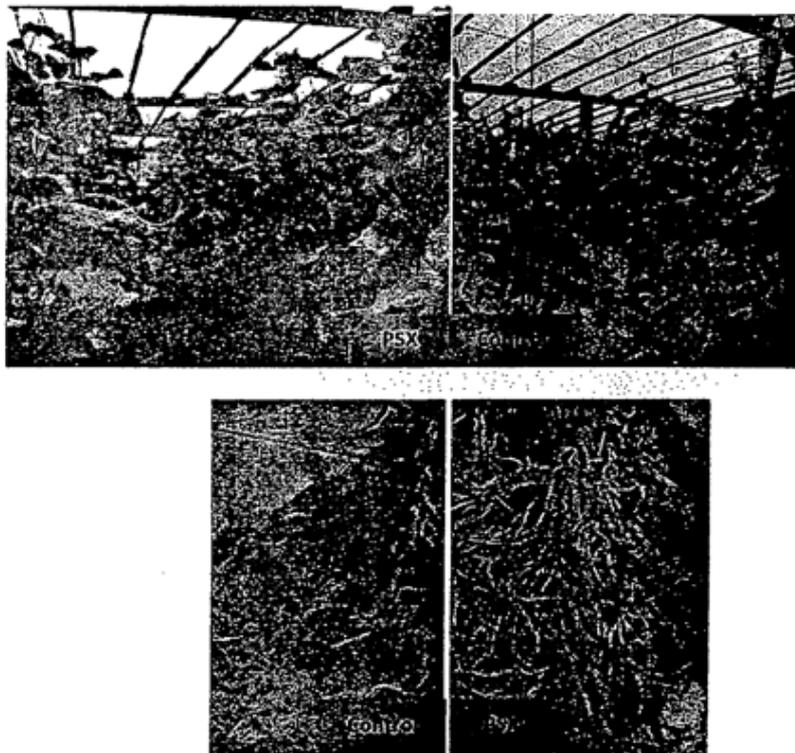
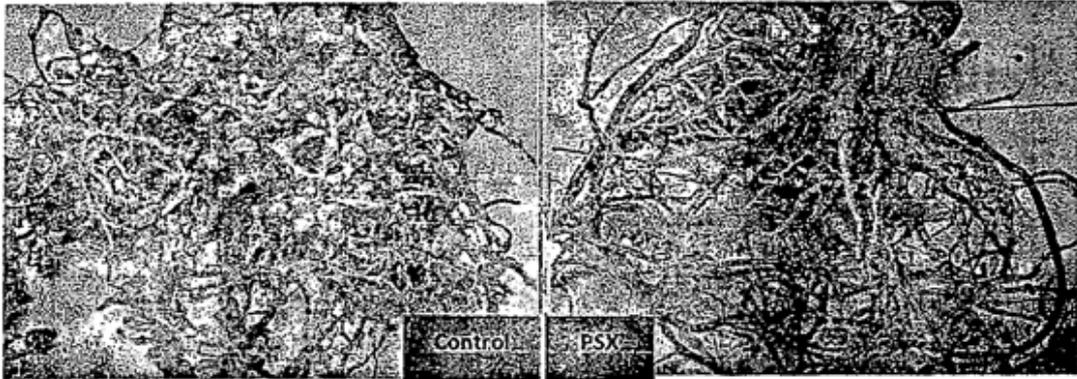


FIGURA 6



**FIGURA 7**



**FIGURA 8**

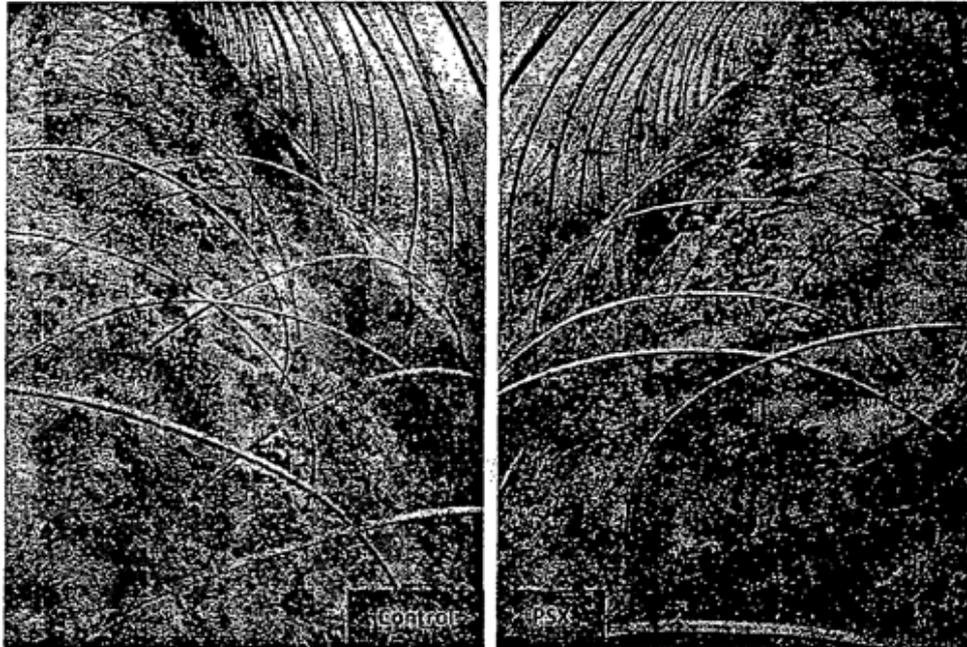


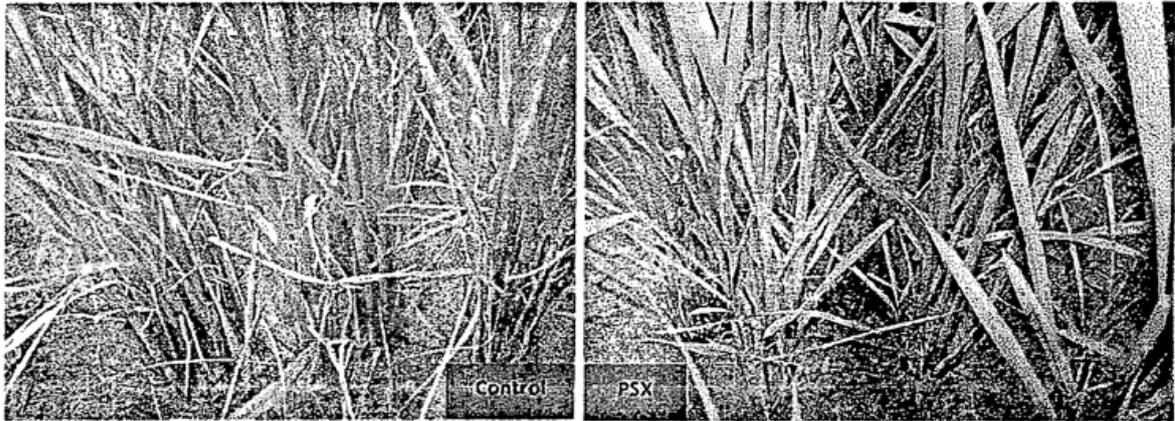
FIGURA 9



FIGURA 10



**FIGURA 11**



**FIGURA 12**

