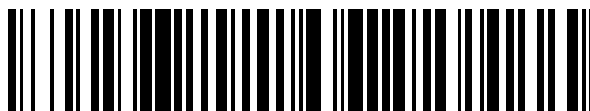


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 965**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 1/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2009** **E 09830560 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013** **EP 2374869**

54 Título: **Control eficaz de enfermedades virales de plantas con cepas de Pseudomonas oleovorans**

30 Prioridad:

**02.12.2008 KR 20080120899**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**18.11.2013**

73 Titular/es:

**LEE, YONG JIN (100.0%)**  
**Hyundai Supervill A-3403 1446-11 Seocho-dong**  
**Seocho-gu**  
**Seoul 137-070, KR**

72 Inventor/es:

**HWANG, IN CHEON;**  
**JANG, CHEOL;**  
**KIM, NAM GYU;**  
**KIM, HYEONG MIN;**  
**LEE, YONG JIN y**  
**LEE, BYUNG MAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 429 965 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**

Control eficaz de enfermedades virales de plantas con cepas de *Pseudomonas oleovorans*

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a una cepa de *Pseudomonas oleovorans* que tiene una actividad de control contra enfermedades virales de plantas; y a un agente microbiano para controlar enfermedades virales de plantas que la comprenden.

Antecedentes de la invención

- 10 El área total de cultivo de los cultivos de jardín ha estado aumentando cada año, sin embargo, se han producido diversas enfermedades virales de plantas en la mayoría de los cultivos de jardín, lo que ha dado como resultado graves perjuicios económicos.

Los virus vegetales que perjudican los cultivos de jardín incluyen el virus del mosaico del pepino (CMV), el virus del mosaico del tabaco (TMV) y el virus Y de la patata (PVY). Con el fin de controlar estos virus, se han desarrollado métodos de control agronómico tales como los que utilizan semillas libres de enfermedades y la generación de nuevos cultivares resistentes a los virus, pero los efectos de los mismos son insignificantes.

- 15 Mientras tanto, se han desarrollado plantas transgénicas resistentes a los virus mediante la introducción de un gen, tal como un gen de la proteína de la envoltura, un gen asociado a la replicación, un gen del ARN satélite y un gen antisentido en las plantas, pero se necesitará más tiempo para lograr un éxito industrial (Fitch, J.H. y Beachy, R.N., *Annu. Rev. Microbiol.*, 47:739-763, 1993).

- 20 Recientemente, ha habido muchos estudios para desarrollar nuevos agentes microbianos que utilizan microorganismos para el control de los virus vegetales. Especialmente, los agentes microbianos son respetuosos con el medio ambiente lo que significa que son capaces de preservar los ecosistemas naturales y no tienen toxicidad para los mamíferos y, por lo tanto, está aumentando la demanda de agentes microbianos.

**Compendio de la invención**

- 25 Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo eficaz en el control de las enfermedades virales de plantas; y un agente microbiano que lo comprenda.

De acuerdo con el objeto anterior, la presente invención proporciona *Pseudomonas oleovorans* KBPF-004 (KCTC 10159BP) que tiene una actividad de control contra enfermedades virales de plantas; un cultivo del mismo; un polvo seco del cultivo, y un agente microbiano para el control de las enfermedades virales de plantas que comprende la cepa, un cultivo de la misma, o un polvo seco del cultivo como ingrediente activo.

**Breve descripción de los dibujos**

Los anteriores y otros objetos y características de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de la invención, cuando se toma junto con los dibujos adjuntos, que muestran, respectivamente:

Fig. 1: el árbol filogenético de la cepa KBPF-004;

- 35 Fig. 2: la actividad de control de la dilución 1:1000 del polvo mojable (PM) de KBPF-004 al 25% contra el virus del mosaico del tabaco;

Fig. 3: el efecto inhibidor del PM de KBPF-004 al 25% contra el virus del mosaico del tabaco confirmado mediante RT-PCR;

- 40 Fig. 4: el efecto inhibidor del PM de KBPF-004 al 25% contra la infección sencilla o múltiple de virus confirmado mediante RT-PCR (C: pimiento rojo Chungyang; D: pimiento Daemyung; M: marcador de tamaño, H: planta sana; N: grupo no tratado, y 1,2: Grupos tratados con KBPF-004);

Fig. 5: la fotografía de las partículas de virus tratadas con PM de KBPF-004 al 25% confirmada mediante microscopía electrónica (TMV: virus del mosaico del tabaco y PVY: virus Y de la patata);

Fig. 6: el efecto inhibidor la infección de PM de KBPF-004 al 25% contra el virus del mosaico del tabaco;

Fig. 7: el efecto de control de PM de KBPF-004 al 25% contra el virus del moteado del pimiento;

- 45 Fig. 8: el efecto de control del PM de KBPF-004 al 25% contra el virus del rayado del arroz (A: el grupo no tratado, y B: grupo tratado con PM de KBPF-004 al 25% diluido 500 veces);

Fig. 9: el efecto de control de los gránulos de KBPF-004 al 2,5% contra el virus del mosaico del tabaco, y

Fig. 10: el efecto de control de suspensiones acuosas (SA) de KBPF-004 al 70% contra el virus del rizado amarillo del tomate (A: no tratado (grupo tratado con insecticida comercial), y B: grupo tratado con la dilución 1:500 de suspensiones acuosas KBPF - 004 al 70% y con insecticida comercial).

#### Descripción detallada de la invención

- 5 La presente invención proporciona la cepa KBPF-004 *Pseudomonas oleovorans* (KCTC 10159BP) que tiene una actividad de control contra enfermedades virales de plantas.

*Pseudomonas oleovorans* KBPF-004 (KCTC 10159BP) forma colonias redondas de color amarillo que tienen bandas pectinadas en el contorno. La cepa tiene la forma de una varilla de 2 ~ 3 µm de largo y 0,3 ~ 0,5 µm de ancho, y tiene un solo flagelo largo.

- 10 La cepa de la invención tiene un ADN<sub>r</sub> 16S con una secuencia de nucleótidos de 1479 pb representada por el SEQ ID NO: 1, que tiene una homología de secuencia de 99,05% con la de *Pseudomonas oleovorans* IAM 1508T. La posición taxonómica de la cepa de la invención se investigó mediante la construcción de un árbol filogenético (Fig. 1) de acuerdo con el método Clustal (Thompson JD et al., Nuc. Acid. Res. 25: 4876-82, 1997).

- 15 La cepa de la invención es diferente de las cepas de *Pseudomonas oleovorans* existentes en cuanto a sus actividades antivirales específicas.

Por lo tanto, la cepa fue denominada *Pseudomonas oleovorans* KBPF-004, y depositada el 11 de Enero de 2002 en la Colección de Cultivos Tipo de Corea (KCTC) bajo el número de acceso KCTC 10159BP.

La presente invención también proporciona un cultivo de *Pseudomonas oleovorans* KBPF-004 (KCTC 10159BP) eficaz en el control de las enfermedades virales de las plantas.

- 20 El cultivo se puede preparar mediante la inoculación de células de *Pseudomonas oleovorans* KBPF-004 (KCTC 10159BP) en un medio y sometiendo a fermentación.

El medio puede comprender los ingredientes convencionales de un medio para el cultivo de bacterias gram negativas sin ninguna limitación. Preferiblemente, el medio puede comprender de 1 g a 20 g de glucosa, de 1 g a 30 g de extracto de levadura, de 0,1 g a 1 g de sulfato de magnesio, de 0,5 g a 5 g de dihidrogenofosfato de potasio y de 0,5 g a 5 g de monohidrogenofosfato de potasio basado en 1 l de agua. Más preferiblemente, el medio puede comprender de 7 g a 14 g de glucosa, de 15 g a 25 g de extracto de levadura, de 0,1 g a 0,2 g de sulfato de magnesio, de 1 g a 2 g de dihidrogenofosfato de potasio y de 1 g a 2 g de monohidrogenofosfato de potasio basado en 1 l de agua.

- 30 La fermentación se puede llevar a cabo a una temperatura de 20°C a 40°C, preferiblemente, de 26°C a 34°C, con una velocidad de aireación de 50 l/min a 200 l/min, preferiblemente, 100 l/min a 120 l/min, y una velocidad de rotación de 100 rpm a 250 rpm, preferiblemente de 120 rpm a 200 rpm. Con el fin de preparar el agente microbiano de la invención, se prefiere emplear tanto células de la cepa como productos filtrados de cultivo.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un polvo seco del cultivo.

- 35 El polvo seco se puede preparar por medio de las etapas de esterilización, concentración y pulverización (liofilización y molienda).

La etapa de esterilización se puede llevar a cabo calentando el cultivo celular, una vez completado el cultivo, a una temperatura de 80°C a 120°C durante 1 a 20 minutos, preferiblemente, de 90°C a 100°C durante 5 a 10 min.

- 40 La etapa de concentración se puede llevar a cabo mediante la concentración del cultivo esterilizado a presión reducida a una temperatura de 40°C a 80°C durante 12 a 48 horas, preferiblemente, de 65°C a 75°C durante 24 a 36 horas.

La etapa de pulverización se puede llevar a cabo, pero sin limitarse a esto, sometiendo el cultivo concentrado al procedimiento de secado mediante liofilización o secado mediante pulverización, y moliéndolo después para preparar un cultivo en polvo.

- 45 El proceso de liofilización se puede llevar a cabo secando el cultivo concentrado aumentando sucesivamente la temperatura de partida desde -80°C durante 48 a 96 horas, preferiblemente, de 60 a 80 horas.

El proceso de molienda se lleva a cabo mediante trituración de los productos liofilizados resultantes utilizando un molino de púas para que tengan tamaños de partícula de 2 mm o menos.

Se puede preparar un agente microbiano formulando las células, el cultivo o el polvo seco del cultivo combinados con agentes tensioactivos, nutrientes, y portadores.

Además, la presente invención proporciona un agente microbiano para controlar enfermedades virales de plantas que comprende células de *Pseudomonas oleovorans* KBPF-004 (KCTC 10159BP), un cultivo de las mismas, o un polvo seco del cultivo como ingrediente activo.

5 El agente microbiano para el control de enfermedades virales de plantas exhibe una actividad antiviral que depende de la concentración del ingrediente activo.

El agente microbiano de la presente invención puede comprender de 2,5 a 70% en peso de células de *Pseudomonas oleovorans* KBPF-004 (KCTC 10159BP), el cultivo de las mismas, o el polvo seco del cultivo; y de 2 a 30% en peso de un agente tensioactivo; y una cantidad residual de un vehículo. Preferiblemente, el agente microbiano de la presente invención puede comprender desde 2,5 hasta 70% en peso de células de *Pseudomonas oleovorans* KBPF-004 (KCTC 10159BP), el cultivo de las mismas, o el polvo seco del cultivo.

Los tensioactivos pueden incluir un tensioactivo aniónico, un tensioactivo no iónico, o una mezcla de los mismos. Los tensioactivos se pueden seleccionar del grupo que consiste en sales de sodio o calcio de compuestos sulfonato tales como alquil(C<sub>8</sub> ~ C<sub>12</sub>)arilsulfonato, dialquil(C<sub>8</sub> ~ C<sub>12</sub>)arilsulfonato, dialquil(C<sub>8</sub> ~ C<sub>12</sub>)sulfosuccinato, lignosulfonato, productos condensados de naftalenosulfonato, productos condensados de naftalenosulfonato-formalina, productos condensados de alquil(C<sub>8</sub> ~ C<sub>12</sub>)naftalenosulfonato-formalina y polioxietilenalquil(C<sub>8</sub> ~ C<sub>12</sub>)-fenilsulfonato; sales de sodio o calcio de compuestos sulfato tales como alquil(C<sub>8</sub> ~ C<sub>12</sub>)sulfato, alquil(C<sub>8</sub> ~ C<sub>12</sub>)arilsulfato, polioxietilenalquil(C<sub>8</sub> ~ C<sub>12</sub>)sulfato y polioxietilenoalquil(C<sub>8</sub> ~ C<sub>12</sub>)fenilsulfato; sales de sodio o calcio de compuestos succinato, tales como polioxialquilensuccinato; tensioactivos aniónicos tales como benzoato de sodio y carboxilato de alquilo; tensioactivos no iónicos tales como polioxietilenalquil(C<sub>12</sub> ~ C<sub>18</sub>)éter, polioxietilenalquil(C<sub>8</sub> ~ C<sub>12</sub>)feniléter, polímeros de polioxietilenalquil(C<sub>8</sub> ~ C<sub>12</sub>)fenilo y copolímeros de óxido de etileno-óxido de propileno; policarboxilato; Triton®100; Tween®80, y una mezcla de los mismos, pero no se limitan a estos.

Los vehículos se pueden seleccionar del grupo que consiste de bentonita, talco, arcilla, caolín, carbonato de calcio, sílice, piedra pómez, tierra de diatomeas, arcilla ferruginosa y calcárea blanca ácida, zeolita, perlita, hulla blanca, sulfato de amonio, urea, glucosa, dextrina, agua, y mezcla de los mismos, pero no se limitan a estos.

25 Asimismo, el agente microbiano de la presente invención se puede formular mediante el uso de tensioactivos y/o vehículos en una forma seleccionada del grupo que consiste en polvos mojables (PM), gránulos dispersables en agua (GA), productos concentrados en suspensión (CS), gránulos, suspensiones acuosas (SA), polvos solubles (PS), gránulos solubles en agua (GS), cápsulas.

30 En la presente invención, las células o el cultivo se pueden suministrar en la forma de agente microbiano para controlar las enfermedades virales de las plantas que los comprenden, o en una forma de almacenamiento separada para un almacenamiento a largo plazo y para la mezcla con otros ingredientes antes de su uso. Para el almacenamiento a largo plazo, las células o cultivos se pueden almacenar en una disolución de almacenamiento de glicerol a menos de -70°C, o en una forma liofilizada.

35 El polvo mojable, una forma del agente microbiano proporcionada en la presente invención, se puede preparar obteniendo un polvo seco del cultivo mediante un procedimiento de post-tratamiento; añadiendo agentes tensioactivos, nutrientes y vehículos a esto, y mezclándolos.

Los gránulos, una forma del agente microbiano proporcionada en la presente invención, se pueden preparar obteniendo un polvo seco del cultivo mediante un procedimiento de post-tratamiento, añadiendo los tensioactivos, vehículos y agentes disgregantes a esto, y mezclándolos. El agente disgregante útil en la presente invención se puede seleccionar del grupo que consiste en bentonita, talco, dialita, caolín, carbonato de calcio y una mezcla de los mismos.

45 Los gránulos pueden comprender, adicionalmente un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en agentes tensioactivos, vehículos inactivos, conservantes, agentes humectantes, agentes facilitadores del suministro, agentes atrayentes, encapsulantes, aglutinantes, emulsionantes, colorantes, protectores de UV, agentes tamponadores o agentes de flujo, además de las células microbianas y/o los productos de fermentación (el cultivo del microorganismo).

Las suspensiones acuosas, una forma del agente microbiano proporcionada en la presente invención, se pueden preparar concentrando en condiciones estériles el cultivo mediante un procedimiento de post-tratamiento, añadiendo a esto un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en los tensioactivos, conservantes, agentes humectantes, agentes promotores del abastecimiento, agentes atrayentes, protectores de UV y agentes tamponadores, y mezclándolos.

El agente microbiano de la presente invención es eficaz para controlar la mayoría de las enfermedades virales de las plantas causadas por grupos de virus patógenos, tales como Alexivirus, Alfamovirus, Ampelovirus, Bimovirus, Begomovirus, Capilovirus, Carlavirus, Carmovirus, Caulimovirus, Closterovirus, Comovirus, Cucumovirus, Crinivirus, Citorabdomovirus, Fabavirus, Flexiviridae, Foveavirus, Furovirus, Geminivirus, Hordeivirus, Ilarivirus, Luteovirus, Maculavirus, Nepovirus, Potexvirus, Potivirus, Fitoreovirus, Polerovirus, Pomovirus, Sadwavirus, Taastropvirus,

Tenuivirus, Tobamovirus, Tobravirus, Tombusvirus, Tospovirus, Tricovirus y una combinación de los mismos. Especialmente, el agente microbiano de la invención es muy eficaz en el control de los grupos de Tobamovirus, Potivirus y Tenuivirus compuestos de forma de ARN monocatenario en forma de barra (en forma de hebra), el grupo Cucumovirus compuesto por ARN monocatenario circular y el grupo de Begomovirus compuesto de ADN monocatenario circular.

Más específicamente, el agente microbiano de la presente invención presenta un excelente efecto de control sobre el Virus del moteado del pimiento (PepMoV), el Virus del moteado suave del pimiento (PMMoV), el Virus del mosaico del pepino (CMV), el Virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV), el Virus del mosaico moteado verde del pepino (CGMMV), el Virus Y de la patata (PVY), el Virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV), el virus del mosaico del nabo (TuMV), o el Virus del rayado del arroz (RSV) y similares.

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren adicionalmente la presente invención sin limitar su alcance.

#### **Ejemplo 1: Aislamiento e identificación de KBPF-004**

##### **<1-1> Aislamiento de la cepa KBPF-004**

Se recogieron muestras de suelo que comprendían raíces de plantas de tabaco de los campos de tabaco ubicados en Eumsung-gun de Chungcheongbuk-do. La muestra de suelo recogida se diluyó con agua destilada estéril, y la dilución se extendió sobre un medio de agar TSA (Difco, Detroit, MI) con un suplemento de 100 ppm de ciclohexamida y se incubó a 27°C para aislar un cultivo puro de una cepa.

##### **<1-2> Identificación de la cepa KBPF-004**

La cepa aislada en el Ejemplo <1-1> se incubó en un medio de Mueller Hinton que comprendía 2,0 g de extracto de ternera, 17,5 g de caseína, 1,5 g de almidón y 17,5 g de agar a 30°C durante 24 horas.

Se formaron colonias redondas de color amarillo de la cepa aislada, que tenían bandas pectinadas en el contorno. La cepa tenía la forma de una varilla de 2 ~ 3 µm de largo y 0,3 ~ 0,5 µm de ancho, y tenía un único flagelo largo. Con el fin de identificar las características bioquímicas de la cepa, se llevaron a cabo el análisis de la composición de ácidos grasos, el análisis en microplacas Biolog GN y el análisis API20NE, y los resultados se muestran en las Tablas 1 a 3, respectivamente.

**<Tabla 1>**

Composición de ácidos grasos	Contenido (%)
C <sub>10:00</sub> 3-OH	2,19
C <sub>12:00</sub>	5,14
C <sub>12:00</sub> 2-OH	2,70
C <sub>12:00</sub> 2-OH	3,79
C <sub>16:01</sub> w7c / <sub>15:00</sub> iso 2-OH	18,74
C <sub>16:00</sub>	20,45
C <sub>18:01</sub> w7c	45,88

**<Tabla 2>**

- Agua	- α-ciclodextrina	- Detrina	- glucógeno	- Tween 40	- Tween 80
- i-eritritol	+ D-fructosa	+ L-fucosa	+ D-galactosa	- gentiobiosa	+ D-glucosa

- D-melibiosa	- β-metil-D glucósido	- D-psicosa	- D-rafinosa	- L-ramnosa	+ D-sorbitol
- Ácido acético	+ Ácido cis- aconítico	+ Ácido cítrico	- Ácido fómico	+ Lactona del ácido D-galactónico	+ Ácido D- galacturónico
- ácido p-hidroxí fenilacético	v ácido itacónico	- α-cetobutírico	+ ácido α- cetoglutámico	- Ácido α- cetovalérico	+ Ácido D,L-láctico
+ Ácido bromosuccínico	- Ácido succinámico	- Glucuronamida	- Alaninamida	v D-alanina	+ L-alanina
- L-histidina	- L- hidroxiprolina	- L-leucina	- L-ornitina	- L-fenilalanina	+ L-prolina
v Ácido urocánico	- Inosina	- Uridina	- Timidina	- Feniletilamina	- Putrescina
- N-acetil-D- galactosamina	- N-acetil-D- glucosamina	- Adonitol	+ L-arabinosa	+ D-arabitol	- celobiosa
+ m-inositol	- D-lactosa	- Lactulosa	- Maltosa	+ Manitol	+ D-manosa
- Sacarosa	+ D-trehalosa	- Turanosa	- Xilitol	+ Piruvato de metilo	+ Monosuccinato de metilo
+ Ácido D-glucónico	+ Ácido D- glucosamínico	+ Ácido D- glucurónico	- Ácido α-hidroxi- butírico	+ Ácido β-hidroxi- butírico	- Ácido γ-hidroxi- butírico
v Ácido malónico	- Ácido propioico	+ Ácido quínico	+ Acido D- sacaricénico	- Ácido sebácico	+ Ácido succínico
- L-alanil-glicina	+ L-asparragina	+ Ácido L- aspártico	+ Ácido L- glutámico	- Ácido glicil-L- aspártico	- Ácido glicil-L- glutámico
+ Ácido L- piroglutámico	- D-serina	+ L-serina	- L-treonina	v D,L-carnitina	- Ácido γ- aminobutírico
- 2-aminoetanol	- 2,3-butanodiol	+ Glicerol	- D,L-glicerol fosfato	- Glucosa-1-fosfato	- Glucosa-6-fosfato
Grado de reacción					
+: Al menos 80%; -: a lo sumo 20%, v: 21-79%					

<Tabla 3>

Ensayo	Reacción/Enzima	Resultado
NO <sub>3</sub>	Reducción de nitratos a nitritos	-
	Reducción de nitratos a nitrógeno	-
TRP	Producción de indol	-

Ensayo	Reacción/Enzima	Resultado
GLU	Acidulación	-
ADH	Arginina dihidrolasa	-
URE	Ureasa	-
ESC	Hidrólisis ( $\beta$ -glucosidasa)	-
GEL	Hidrólisis (proteasa)	-
PNG	$\beta$ -glucosidasa	-
GLU	Asimilación de la glucosa	+
RAR	Asimilación de arabinosa	+
MNE	Asimilación de manosa	+
MAN	Asimilación de manitol	+
NAG	Asimilación de N-acetil-glucosamina	-
MAL	Asimilación de maltosa	-
GNT	Asimilación de gluconato	+
CAP	Asimilación de caprato	+
ADI	Asimilación de adipato	-
MLT	Asimilación de malato	+
CIT	Asimilación de citrato	+
PAC	Asimilación de fenil-acetato	-
OX	Citocromo oxidasa	+

- 5 Asimismo, se identificó la cepa de la invención basándose en la secuenciación de nucleótidos del ADNr 16S. La cepa aislada tiene ADNr 16S con una secuencia de nucleótidos de 1479 pb (SEQ ID NO: 1) que muestra una homología de secuencia de 99,05% con la de la cepa IAM 1508T de *Pseudomonas oleovorans*. La posición taxonómica de la cepa de la invención se determinó mediante la construcción de un árbol filogenético (Fig. 1) de acuerdo con el método Clustal (Thompson JD et al., *Nuc. Acid. Res.* 25: 4876-82, 1997).

La cepa se denominó *Pseudomonas oleovorans* KBPF-004, y se depositó el 11 de Enero de 2002 en la Colección de Cultivos Tipo de Corea (KCTC) bajo el número de acceso de KCTC 10159BP.

<1-3> Especificidad de cepa KBPF-004 que tiene actividades antivirales

- 10 Se cultivaron la cepa KBPF-004 y *Pseudomonas oleovorans* ATCC 8062 como cepa tipo de la misma en el medio de Mueller Hinton con sacudimiento a 30°C durante 24 horas. El cultivo obtenido se diluyó 20 veces y se examinaron las actividades antivirales del mismo de acuerdo con el método de la media hoja de tabaco (Kim et al., *Plant Pathol. J.* 20 (4): 293-296, 2004).

El método de la media hoja de tabaco es un método que emplea el fenómeno de que *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc como planta anfitriona de lesiones locales forma manchas de color negro debido a la necrosis de las células alrededor de las regiones infectadas por el virus del mosaico del tabaco por el gen de resistencia del virus del mosaico del tabaco. Específicamente, se pulverizó el material de ensayo para el examen de la actividad anti-viral sobre medias hojas de las 3ª y 4ª hojas de la parte superior de la planta anfitriona con la lesión local en la fase foliar de 7 hoja. A continuación, se aplicó uniformemente carborundo (abrasivo) a la 3ª y 4ª hojas y se aplicó a estas una dilución del virus del mosaico del tabaco para examinar la actividad anti-viral del material de ensayo. El carborundo aplicado induce arañazos en las hojas de tabaco y el virus del mosaico del tabaco entra en las plantas anfitrionas a través de los arañazos. Después de 3-4 días de la inoculación, se encontraron manchas de color negro en las hojas infectadas.

Los valores de control de los materiales de ensayo se calcularon mediante la siguiente fórmula y los resultados se muestran en la Tabla 4.

Valor de control (%) =  $[1 - (\text{Número de manchas negras en las medias hojas tratadas con la cepa} / \text{Número de manchas negras en las medias hojas no tratadas})] \times 100$

<Tabla 4>

	Cepa	Actividad anti-viral
Cepa tipo	<i>Pseudomonas oleovorans</i> ATCC 8062	19,7%
Cepa KBPF-004	<i>Pseudomonas oleovorans</i> KCTC 10159BP	96,0%

Como se muestra en la Tabla 4, la cepa KBPF-004 tiene una actividad anti-viral específicamente alta, lo que demuestra que la cepa KBPF-004 es una cepa específica que tiene una actividad anti-viral diferente en comparación con las cepas de *Pseudomonas oleovorans* existentes.

<1-4> Especificidad de materiales activos anti-virales de KBPF-004

Se sabe que la especie *Pseudomonas oleovorans* produce polihidroxialcanoato (PHA) como polímero biodegradable. Con el fin de identificar si la actividad anti-viral específica de la cepa KBPF-004 es inducida por PHA o no, se determinaron la actividad anti-viral de PHA (Sigma) y un cultivo de la cepa KBPF-004, respectivamente, de acuerdo con el método de la media hoja de tabaco, y los resultados se muestran en la Tabla 5.

<Tabla 5>

	Actividad anti-viral
PHA	0,0%
cultivo de la cepa KBPF-004	97,0%

Como se muestra en la Tabla 5, PHA no exhibe actividad anti-viral, mientras que el cultivo de la cepa KBPF-004 exhibe una elevada actividad anti-viral. Estos resultados demuestran que los materiales activos anti-virales producidos por la cepa KBPF-004 son diferentes de PHA.

Adicionalmente, con el fin de identificar si los materiales activos anti-virales producidos por la cepa KBPF-004 también presentan un efecto antibiótico o no, se llevó a cabo el análisis del disco de papel utilizando siete hongos patógenos de plantas y cuatro cepas supersensibles a antibióticos para comprobar la formulación de los círculos de inhibición. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

<Tabla 6>

	Nombre científico	Actividad
Hongos patógenos de plantas	<i>Alternaria mali</i>	-

	Nombre científico	Actividad
	<i>Botrytis cinerea</i>	-
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-
	<i>Magnaporthe grisea</i>	-
	<i>Fusarium oxysporum</i>	-
	<i>Phytophthora capsici</i>	-
	<i>Rhizoctonia solani</i>	-
Cepas supersensibles a antibióticos	<i>E.coli</i> KCTC 1682	-
	<i>E.coli</i> KCTC 1683	-
	<i>E.coli</i> KCTC 1923	-
	<i>E. coli</i> KCTC 1924	-

Como se muestra en la Tabla 6, tanto los hongos patógenos de plantas como las cepas supersensibles a antibióticos crecen sin inhibición por el cultivo de la cepa KBPF-004. Esto demuestra que los materiales activos anti-virales producidos por la cepa KBPF-004 son diferentes de los materiales antibióticos existentes.

## 5 Ejemplo 2: Preparación del medio optimizado para la producción de materiales activos anti-virales

Con el fin de determinar una condición del medio para la producción de materiales activos anti-virales superiores al medio de Mueller Hinton, se empleó una variedad de fuentes de carbono y nitrógeno para la preparación de un medio optimizado.

10 Específicamente, la cepa se sometió a cultivo con sacudimiento a 30°C durante 24 horas mediante el uso de dextrina, glucosa, glicerol, sacarosa o almidón soluble en agua como fuente de carbono, y peptona, extracto de levadura, caseína, extracto de salvado de trigo, dihidrogenofosfato de amonio o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Se midió la densidad óptica (DO) del cultivo obtenido a 600 nm, y la actividad anti-viral se determinó por medio del método de la media hoja de tabaco. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

<Tabla 7>

Medio	Actividad anti-viral (dilución 1/40)	Densidad óptica (660 nm)
Medio Mueller Hinton	57%	9,2
Medio Optimizado	92%	23,2

15 Como se muestra en la Tabla 7, el medio optimizado con un suplemento de 1 a 5% en peso de glucosa como fuente de carbono y de 1 a 5% en peso de extracto de levadura como fuente de nitrógeno presenta un crecimiento de la cepa y una actividad antiviral significativamente mejorado en comparación con el medio de Mueller Hinton.

## Ejemplo 3: Preparación de un cultivo y un polvo seco de la cepa KBPF-004

20 <3-1> Preparación de un cultivo de la cepa KBPF-004

Con el fin de preparar un cultivo de la cepa KBPF-004 a gran escala, se empleó un medio con un suplemento de 10 g de glucosa, 20 g de extracto de levadura, 0,2 g de sulfato de magnesio, 2 g de dihidrogenofosfato de potasio y 2 g de hidrogenofosfato de potasio sobre la base de 1 l de agua.

Se llevó a cabo un procedimiento de fermentación para la producción a gran escala empleando un fermentador a escala piloto. Se fermentaron 30 l de cultivo de la cepa en un fermentador de 50 l y el cultivo resultante se transportó a un fermentador de 500 l después de terminar el cultivo. En la misma línea, se fermentaron 3.000 l de cultivo de la cepa en un fermentador 5000 de l. El procedimiento de fermentación se llevó a cabo a una temperatura de 30°C, con una velocidad de aireación de 1 VVM (volumen de aire añadido al volumen de líquido por minuto), y una velocidad de rotación de 200 rpm (fermentador de 50 l), 150 rpm (fermentador de 500 l) o de 80 rpm (fermentador de 5.000 l) durante 1 día para preparar el cultivo de la cepa KBPF-004.

#### <3-2> Preparación de un polvo seco del cultivo de la cepa KBPF-004

Con el fin de preparar un polvo seco del cultivo de la cepa KBPF-004, se llevó a cabo un procedimiento de post-tratamiento que comprendía la esterilización de la cepa, la concentración, la liofilización y la molienda.

El procedimiento de esterilización cepa se llevó a cabo calentando el fermentador a 80°C durante 20 min después del cultivo para destruir las células. El procedimiento de concentración se llevó a cabo mediante la concentración del cultivo resultante a presión reducida a 65°C durante 32 horas. El procedimiento de liofilización se llevó a cabo calentando el cultivo concentrado con una elevación gradual de la temperatura partiendo de -80°C durante 52 horas. El procedimiento de molienda se llevó a cabo triturando los productos liofilizados utilizando un molino de púas para preparar un polvo seco que tenía un tamaño de partícula de menos de 2 mm.

#### **Ejemplo 4: Preparación de agentes microbianos utilizando productos del cultivo de la cepa KBPF-004**

Se prepararon agentes microbianos de la cepa KBPF-004 tales como polvos mojables (PM), gránulos dispersables en agua (GA), productos concentrados de suspensión (CS) y gránulos mediante el uso del polvo seco del cultivo de la cepa KBPF-004, y se prepararon suspensiones acuosas (SA) utilizando el cultivo acuoso de la cepa KBPF-004.

#### <4-1> Preparación de un polvo mojado utilizando polvo seco del cultivo de la cepa KBPF-004

Con el fin de formular un polvo mojado a partir del polvo seco del cultivo de la cepa KBPF-004, se mezcló 25% en peso del polvo seco del cultivo de la cepa KBPF-004 obtenido en el apartado <3-2> con 3% en peso de polioxietilenoctilfenilsulfato, 3% en peso de lignosulfonato de sodio, 2% en peso de laurilsulfato de sodio, 5% en peso de hulla blanca y una cantidad residual de caolín, y la mezcla se trituró utilizando una máquina trituradora en seco. El tamaño medio de partícula de la mezcla triturada fue 6,47 µm. El polvo mojado así obtenido se sometió a análisis físico-químicos y biológicos, y los resultados se muestran en el apartado <4-6> de más abajo.

#### <4-2> Preparación de gránulos dispersables en agua utilizando polvo seco del cultivo de la cepa KBPF-004

Con el fin de formular gránulos dispersables en agua a partir del polvo seco del cultivo de la cepa KBPF-004, se mezcló 25% en peso de polvo seco del cultivo de la cepa KBPF-004 obtenido en el apartado <3-2> con 6% en peso de producto condensado de naftalenosulfonato de sodio-formalina, 2% en peso de laurilsulfato de sodio, 2% en peso de lignosulfonato de sodio, 5% en peso de tierra de diatomeas y una cantidad residual de carbonato de calcio, y la mezcla se trituró utilizando una máquina trituradora en seco. El tamaño medio de partícula de la mezcla triturada fue 6,08 µm. A continuación, se añadió a la mezcla 10% en peso de agua, basado en la mezcla, y la mezcla resultante se sometió a un procedimiento de amasado y moldeado utilizando una máquina granuladora y se secó durante 30 minutos en una secadora de lecho fluidificado para obtener los gránulos dispersables en agua. Los gránulos dispersables en agua obtenidos de este modo se sometieron a análisis físicoquímicos y biológicos, y los resultados se muestran en el apartado <4-6> de más abajo.

#### <4-3> Preparación de un producto concentrado en suspensión utilizando polvo seco del cultivo de la cepa KBPF-004

Con el fin de formular un producto concentrado en suspensión a partir del polvo seco de cultivo de la cepa KBPF-004, se mezcló 25% en peso del polvo seco del cultivo de la cepa KBPF-004 obtenido en el apartado <3-2> con 3% en peso de polioxietilenoctilfeniléter, 2% en peso de copolímero de óxido de etileno-óxido de propileno, 2% en peso de dioctilsulfosuccinato de sodio, 10% en peso de propilenglicol y 55,5% en peso de agua destilada, y la mezcla resultante se trituró utilizando una máquina de trituración en húmedo. El tamaño medio de partícula de la mezcla triturada fue de 2,45 µm. A continuación, se añadió a la mezcla 2,5% en peso de goma xantana acuosa al 2% preparada mediante etapas de agitación y mezclado, y la mezcla resultante se agitó y se mezcló mediante una mezcladora para obtener un producto concentrado en suspensión en forma de una suspensión acuosa. El producto concentrado en suspensión obtenido de ese modo se sometió a análisis físico-químicos y biológicos, y los resultados se muestran en el apartado <4-6> de más abajo.

#### <4-4> Preparación de gránulos utilizando polvo seco del cultivo de la cepa KBPF-004

Con el fin de examinar el efecto de control de la cepa KBPF-004 cuando se aplica a los suelos, se mezcló 2,5% en peso del polvo seco del cultivo de la cepa KBPF-004 obtenido en el apartado <3-2> con 0,5% en peso de lignosulfonato de calcio y 1,5% en peso de caolín, y la mezcla se trituró utilizando una máquina trituradora en seco para preparar una mezcla triturada que tenía un tamaño medio de partícula de 6,25 µm. Se disolvieron 1% en peso de poli(alcohol vinílico) y 0,5% en peso de dextrina en 1,5% en peso de agua para preparar una disolución aglutinante. La disolución aglutinante se aplicó a 94% en peso de arena, y la mezcla preparada anteriormente se aplicó como recubrimiento sobre la misma fue revestida sobre la misma. Los gránulos resultantes se secaron en una secadora de lecho fluidificado durante 30 minutos. Los gránulos obtenidos de ese modo se sometieron a análisis físico-químicos y biológicos, y los resultados se muestran en el apartado <4-6> de más abajo.

#### <4-5> Preparación de suspensiones acuosas utilizando el cultivo de la cepa KBPF-004

Con el fin de formular suspensiones acuosas a partir del cultivo acuoso de la cepa KBPF-004, el cultivo acuoso de la cepa KBPF-004 obtenido en el apartado <3-1> se sometió al procedimiento de post-tratamiento que comprendía la destrucción y la concentración de la cepa, y se mezcló 70% en peso del cultivo de la cepa obtenido de este modo con 5% en peso de polioxietilenoetilfeniléter, 5% en peso de dioctilsulfosuccinato de sodio, 10% en peso de propilenglicol y 10% en peso de etanol. La mezcla resultante se agitó y se mezcló para obtener las suspensiones acuosas. Las suspensiones acuosas obtenidas de este modo se sometieron a análisis físico-químicos y biológicos, y los resultados se muestran en el apartado <4-6> de más abajo.

#### <4-6> Ensayo de las propiedades de formulación y el efecto antiviral contra el virus del mosaico del tabaco

Se determinaron las propiedades (forma de formulación, apariencia, humectabilidad, finura y estabilidad de almacenamiento) y los valores de control de acuerdo con el método de la media hoja de tabaco de las formulaciones obtenidas en el apartado <4-1> a <4-5> y los resultados se muestran en la Tabla 8 (Método de ensayo de productos químicos agrícolas notificado por la *Administración para el Desarrollo Rural Coreana*).

<Tabla 8>

Ejemplo	Propiedades					Valor de Control (%)
	Formulación	Apariencia	Humectabilidad	Finura	Estabilidad de almacenamiento	
<4-1>	PM al 25%	polvo	58 seg	99,3%	Buena	95,7
<4-2>	GA al 25%	gránulo	1 min 10 seg	99,6%	Buena	85,8
<4-3>	SC al 25%	líquido	20 seg	99,7%	Buena	90,4
<4-4>	gránulo al 2,5%	gránulo	-	-	Buena	92,3
<4-5>	SA al 70%	líquido	-	-	Buena	91,3
Norma de examen			Aproximadamente de 2 min	44 µm, al menos 98%	50°C 4 semanas	Método de la media hoja de tabaco

Como resultado, las cinco formulaciones mostraron propiedades físicas y el efecto antiviral adecuados de acuerdo con la norma de examen de productos químicos agrícolas por los reglamentos de aplicación de la ley de gestión de productos agroquímicos coreana. Entre las formulaciones, el polvo mojable al 25% obtenido en el apartado <4-1> mostró el efecto anti-viral más sobresaliente, por lo tanto, se emplearon el polvo mojable al 25%, los gránulos al 2,5% y la SA al 70% de KBPF-004 en los siguientes ensayos.

#### <4-7> Ensayo para determinar la estabilidad de envejecimiento del polvo mojable al 25%

Con el fin de someter a ensayo la estabilidad de envejecimiento del polvo mojable al 25% obtenido en el apartado <4-1>, se determinó el grado de pérdida de actividad anti-viral del polvo mojable mediante el método de la media hoja de tabaco cada semana, mientras estaba almacenado a 54°C durante al menos 6 semanas, y los resultados se muestran en la Fig. 2. Como se muestra en la Fig. 2, el polvo mojable de la invención exhibió actividad antiviral sobre el virus del mosaico del tabaco a 54°C durante al menos 6 semanas. Por lo tanto, se fijó una garantía de eficacia de

tres años para el polvo mojabable de la invención según las directrices de ensayo y métodos de registro de los productos químicos agrícolas notificadas por la Administración para el Desarrollo Rural de Corea.

**Ejemplo 5: Ensayo para determinar el efecto inhibidor del polvo mojabable al 25% de KBPF-004 sobre los virus de las plantas**

5 <5-1> Efecto inhibidor dependiente de la concentración en la infección por el virus del mosaico del tabaco

Con el fin de examinar el efecto inhibidor del polvo mojabable al 25% de KBPF-004 sobre la infección por el virus del mosaico del tabaco de acuerdo con sus concentraciones, se llevó a cabo una RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) sobre las hojas de tabaco utilizando cebadores que reconocían una secuencia de nucleótidos específica del ARN genómico del virus (región de la envoltura proteica) (Choi et al., *Plant Pathol. J.*, 14: 7-12, 1998; Yoon, *Tesis Doctoral*, Universidad para Mujeres de Seúl, Seúl, 166, 2003) y los resultados se muestran en la Fig. 3.

Como se muestra en la Fig. 3, no se detectó ningún virus del mosaico del tabaco, cuando las hojas de tabaco se trataron con polvo mojabable al 25% de KBPF-004 en una cantidad que oscilaba de 0,005 g/ml a 0,02 g/ml. Este resultado demuestra que la cepa KBPF-004 inhibe eficazmente la infección por el virus del mosaico del tabaco.

15 <5-2> Efecto de control de la infección viral de plantas

Con el fin de examinar el efecto de control del polvo mojabable al 25% de KBPF-004 sobre la infección única y compleja de los virus vegetales, se pulverizó una dilución 1:1000 del polvo mojabable al 25% de KBPF-004 obtenido en el apartado <4-1> sobre pimientos rojos Chungyang utilizando un pulverizador. A continuación, se inocularon sobre los mismos el Virus del moteado del pimiento (PepMoV), Virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) y el Virus del mosaico del pepino (CMV) respectivamente o combinados, y se llevó a cabo la RT-PCR para identificar si los productos de RT-PCR se detectaban o no. Los resultados se muestran en la Fig. 4.

Como se muestra en la Fig. 4, los pimientos rojos Chungyang inoculado con PepMoV solamente no0 mostraron ningún virus hasta los 30 a 40 días, con independencia de su especie, y los pimientos rojos Chungyang inoculados con el Virus del moteado del pimiento + Virus del mosaico del pepino no mostraron virus hasta los 30 días.

25 Asimismo, las muestras con Virus del moteado del pimiento, Virus del moteado del pimiento + Virus del moteado suave del pimiento, y Virus del moteado del pimiento + Virus del mosaico del pepino para los cuales se habían confirmado las actividades antivirales en el análisis de RT-PCR se analizaron mediante ELISA (análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas) (Clark, et al., *J. Gen. Virol.* 34: 475-483, 1977) y los resultados se muestran en la Tabla 9.

30 <Tabla 9>

Virus infectado	Antisuero	Días después de la inoculación	Absorbancia ( $A_{405\text{ nm}}$ )		
			Grupo tratado con KBPF-004	Grupo no tratado	Planta sana
PepMoV (Infectado individualmente)	PepMoV	10	0,202	0,981	0,232
		30	0,210	1,900	-
PepMoV + PMMoV (Infectado complejo)	PepMoV	10	0,173	1,200	0,243
		30	0,788	1,876	-
	PMMoV	10	0,836	-	0,243
		30	1,504	1,366	-
PepMoV + CMV (Infectados complejo)	PepMoV	10	0,310	-	0,187
		30	0,286	-	-
	CMV	10	0,457	1,964	0,187

Virus infectado	Antisuero	Días después de la inoculación	Absorbancia (A <sub>405 nm</sub> )		
			Grupo tratado con KBPF-004	Grupo no tratado	Planta sana
		30	0,382	-	-

Como se muestra en la Tabla 9, los efectos de control de la cepa KBPF-004 de la invención se mostraron de manera significativa en los niveles moleculares y de antisuero.

#### <5-3> Efecto inhibidor de la infección sobre el ARN del genoma del virus

- 5 Con el fin de examinar el efecto inhibidor del polvo mojable al 25% de KBPF-004 sobre la infección por el ARN genómico del Virus del moteado suave del pimiento (PMMoV), se pulverizó sobre las plantas de tabaco (*Nicotiana glutinosa*) una dilución 1:1000 del polvo mojable al 25% de KBPF-004 obtenido en el apartado <4-1>. A continuación, se inoculó el ARN del genoma del virus del moteado suave del pimiento en las plantas, y se determinaron los efectos inhibidores de la infección y los resultados se muestran en la Tabla 10.

#### 10 <Tabla 10>

Tratamiento		Lesiones/3 medias hojas*	Inhibición (%)
Grupo no tratado	ARN de PMMoV + tampón fosfato	531	0
KBPF-004	ARN de PMMoV + tampón fosfato	3	99,4
* Número de lesiones formadas en 3 medias hojas de tabaco ( <i>Nicotiana glutinosa</i> )			

Como se muestra en la Tabla 10, el grupo tratado con el polvo mojable al 25% de KBPF-004 no muestra ninguna infección por virus, mientras que el grupo no tratado muestra infección por PMMoV, lo que sugiere que la cepa KBPF-004 influye directamente sobre el ARN del genoma del virus.

#### 15 <5-4> Efecto inductor de resistencia

Con el fin de examinar el efecto inductor de resistencia del polvo mojable al 15% de KBPF-004, se pulverizó una dilución 1:1000 del polvo mojable al 25% KBPF-004 sobre las hojas inferiores de dos especies de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc y *Nicotiana glutinosa*). Después de 10 días, se inoculó a las mismas el Virus del moteado suave del pimiento. Se calcularon los valores de control y los resultados se muestran en la Tabla 11.

#### 20 <Tabla 11>

Tratamiento	Planta anfitriona	Número de lesiones (valor de control)		
		Hoja tratada (Hoja inferior)	1ª hoja superior	2ª hoja superior
KBPF-004	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi nc	51 (71,0%)	96 (55,9%)	78 (57,3%)
	<i>Nicotiana glutinosa</i>	83 (74,8%)	118 (45,8%)	169 (46,6%)
Grupo no tratado	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi nc	176	218	183
	<i>Nicotiana glutinosa</i>	330	349	317

Como se muestra en la Tabla 11, en el grupo tratado con polvo mojable al 25% de KBPF-004, se mostró efecto de control sobre el Virus del moteado suave del pimiento en las 1ª y 2ª hojas superiores, así como en las hojas tratadas (hojas inferiores). Por lo tanto, se demuestra que el polvo mojable al 25% de KBPF-004 tiene un efecto inductor de resistencia así como efectos inhibidores directos sobre la infección y la reproducción del virus.

#### 5 <5-5> Efecto inhibidor del Virus confirmado mediante microscopia electrónica.

Con el fin de confirmar el efecto inhibidor directo del virus del agente microbiano de la invención, se analizó el efecto de la cepa KBPF-004 sobre la proteína de la envoltura viral mediante microscopia electrónica.

Se inocularon Virus del mosaico del tabaco (TMV) y Virus Y de la patata (PVY), respectivamente, en una planta anfitriona para su proliferación (*Nicotiana benthamiana*). Después de 2 semanas, se recogieron 50 g de las hojas infectadas sistémicamente y se purificaron para determinar las partículas de virus, respectivamente. A continuación, las partículas de virus purificadas se mezclaron con una dilución 1/100 del polvo mojable al 25% de KBPF-004 (1000 ppm) en una proporción 1:1 (v/v), y la mezcla resultante se analizó mediante microscopia electrónica. Los resultados se muestran en la Fig. 5.

Como se muestra en la Fig. 5, se encontró que la longitud de las partículas de virus era corta en el grupo tratado con el polvo mojable al 25% de KBPF-004, lo que sugiere que las partículas de TMV o PVY son segmentadas por la cepa KBPF-004.

Adicionalmente, las muestras de partículas de virus segmentadas obtenidas anteriormente se sometieron al método de la media hoja de tabaco para examinar si la actividad viral se mantenía o no, y los resultados se muestran en la Fig. 6. Como resultado, el número de partículas de virus segmentadas se incrementó en función del tiempo de tratamiento con la cepa, y el número de lesiones infectadas de la planta anfitriona disminuyó rápidamente.

#### Ejemplo 6: Eficacia de la cepa KBPF-004 sobre las principales enfermedades virales de las plantas

##### <6-1> Escrutinio de la eficacia

Con el fin de evaluar la eficacia del agente microbiano de la cepa KBPF-004 sobre los principales virus vegetales, se llevó a cabo un escrutinio de eficacia en una variedad de plantas en macetas de invernadero.

El escrutinio se llevó a cabo sobre plántulas (plantas jóvenes), y plantas adultas, si fuera necesario, de acuerdo con un método común para el escrutinio de enfermedades virales de plantas.

Para el escrutinio de eficacia, se emplearon como virus vegetales el grupo Tobamovirus tal como el Virus del mosaico del tabaco, el Virus del mosaico moteado verde del pepino y el Virus del moteado suave del Pimiento; el grupo Potivirus tal como el virus del moteado del pimiento, el Virus del mosaico amarillo del calabacín, el Virus Y de la patata y el Virus del mosaico de la sandía; el grupo Cucumovirus tal como el Virus del mosaico del pepino, y se emplearon como plantas anfitrionas tabaco, pimiento, calabacín, pepino, sandía, calabaza, col y melón.

Específicamente, se pulverizaron diluciones 1:250, 1:500 y 1:1000 del polvo mojable al 25% de KBPF-004 obtenido en el apartado <4-1> sobre las plantas anfitrionas en una cantidad de 20 L/1.000 m<sup>2</sup>, respectivamente, y se inocularon en las mismas diluciones 1:1000 del respectivo virus de planta. La eficacia del agente microbiano se evaluó mediante el resultado del método de la media hoja de tabaco para el Virus del mosaico del tabaco, y mediante valores de control calculados utilizando la tasa de plantas enfermas (%) de acuerdo con la siguiente fórmula para otros virus (◎: Excelente; O: bueno; Δ: insuficiente; y X: malo). Los resultados se muestran en la Tabla 12.

$$\text{Tasa de plantas enfermas (\%)} = (\text{Número de plantas enfermas} / \text{Número de plantas de ensayo}) \times 100$$

$$\text{Valor de control (\%)} = [1 - (\text{Tasa de plantas enfermas de las plantas tratadas} / \text{Tasa de plantas enfermas de las plantas no tratadas}) \times 100]$$

<Tabla 12>

Virus	Planta anfitriona	Actividad de control		
		Dilución de 250 veces	Dilución de 500 veces	Dilución de 1000 veces

Virus	Planta anfitriona	Actividad de control		
		Dilución de 250 veces	Dilución de 500 veces	Dilución de 1000 veces
Virus del mosaico del tabaco	Tabaco	⊙	⊙	⊙
Virus del mosaico moteado verde del pepino	Sandía	O	O	Δ
	Pepino	O	O	Δ
Virus del moteado suave del pimiento	Pimiento	⊙	⊙	⊙
Virus del moteado pimiento	Pimiento	⊙	⊙	⊙
Virus del mosaico amarillo del calabacín	Calabacín	⊙	⊙	⊙
Virus del mosaico de la sandía	Sandía	⊙	O	O
Virus Y de la patata	Pepino	⊙	⊙	⊙
	Tabaco	⊙	⊙	⊙
Virus del mosaico del pepino	Melón	⊙	O	O

<6-2> Evaluación de la eficacia en el campo sobre el virus del mosaico del tabaco

En el ensayo de control de la eficacia sobre el virus del moteado del pimiento del apartado <6-1>, se calculó el valor de control del polvo mojabable al 25% de KBPF-004 después de 4 semanas desde la inoculación del virus del mosaico del tabaco, y los resultados se muestran en la Tabla 13. Como resultado, el valor de control de las diluciones de 1:500 y 1:1.000 fue de 90,8% y 76,8%, respectivamente, que son superiores que la de leche en polvo desnatada como control. Por lo tanto, los materiales activos anti-virales de la cepa KBPF-004 muestran un efecto de control de una manera dependiente de la concentración.

<Tabla 13>

Grupo	Tasa de dilución	Tasa de plantas enfermas (%)				Diferencia significativa (DMRT)		Valor de control (%)
		A	B	C	Promedio			
PM al 25% KBPF-004	1:500	3,8	1,9	1,9	2,5	a		90,8
	1:1000	15,4	0	3,8	6,4	a		76,8
Leche en polvo desnatada	1:10	23,5	29,3	15,4	22,7		b	17,5

Grupo	Tasa de dilución	Tasa de plantas enfermas (%)				Diferencia significativa (DMRT)		Valor de control (%)
		A	B	C	Promedio			
Grupo no tratado	-	32,7	25,0	25,0	27,6		b	
* Coeficiente de variación (CV): 34,6%								

#### <6-3> Evaluación de la eficacia en el campo sobre el virus del moteado del pimiento

En el ensayo de control de la eficacia sobre el virus del moteado del pimiento del apartado <6-1>, se calculó el valor de control del polvo mojable al 25% de KBPF-004 y los resultados se muestran en la Tabla 14 y en la Fig. 7. Las tasas de inhibición de la infección de las diluciones de 1:500 y 1:1.000 contra el virus del moteado del pimiento fueron ambas 100%. Además, en el grupo no tratado, la tasa de infección por el virus del moteado del pimiento fue 5,4% antes del tratamiento y aumentó a 11,8% después del tratamiento. Sin embargo, en el grupo tratado con polvo mojable al 25% de KBPF-004, la tasa de infección por el virus del moteado del pimiento se redujo después del tratamiento y el virus ya no se transmitió más.

<Tabla 14>

Grupo	Tasa de dilución	Tasa de infección por Virus (%)		Progreso de la Infección (%)	Tasa de inhibición de la Infección (%)
		Antes del tratamiento	Después del tratamiento		
PM al 25% de KBPF-004	1:500	13,3	9,5	0	100
	1:1000	11,8	11,8	0	100
Grupo no tratado	-	5,4	11,8	203,4	0

#### <6-4> Evaluación de la eficacia de la cepa KBPF-004 sobre el virus del rayado del arroz en un invernadero

En el ensayo de control de la eficacia sobre el virus del rayado del arroz del apartado <6-1>, se rociaron diluciones 1:500 y 1:1000 del polvo mojable al 25% de KBPF-004, respectivamente, sobre plántulas de arroz 1 día antes de la inoculación de los insectos virulíferos (*Laodelphax striatulus* F). Catorce días después de la inoculación de los insectos virulíferos, se calculó el valor de control. Como se puede observar a partir de los resultados que se muestran en la Tabla 15 y en la Fig. 8, la dilución 1:500 mostró una excelente eficacia de control en comparación con el grupo no tratado.

<Tabla 15>

Grupo	Tasa de dilución	Gravedad de la enfermedad (%)				Diferencia significativa (DMRT)		Valor de control (%)
		A	B	C	Promedio			
PM al 25% de KBPF-004	1:500	4	4	2	3,3,	a		89,6
	1:1000	16	28	10	18,0	a	b	43,8
Grupo no tratado	-	44	28	24	32,0		b	

Grupo	Tasa de dilución	Gravedad de la enfermedad (%)				Diferencia significativa (DMRT)	Valor de control (%)
		A	B	C	Promedio		
* Coeficiente de variación (CV): 51,3%							

Además, la dilución 1:500 del polvo mojable al 25% de KBPF-004 se roció directamente sobre los insectos virulíferos (*Laodelphax striatillus* F) y después de 1 día, los insectos se inoculaban a las plántulas de arroz. El valor de control se determinó como antes. Como se muestra en la Tabla 16, la tasa de transmisión del virus del rayado del arroz se redujo significativamente.

<Tabla 16>

Grupo	Tasa de Dilución	Gravedad de la enfermedad (%)				Diferencia significativa (DMRT)		Valor de Control (%)
		A	B	C	Promedio			
PM al 25% de KBPF-004	1:500	0,5	0,3	0,1	0,3	a		99,4
No tratado	-	54	43	65	54,0		b	
* Coeficiente de variación (CV): 28,9%								

#### <6-5> Evaluación de la eficacia de los gránulos de KBPF-004 sobre el virus del mosaico del tabaco

Con el fin de examinar la eficacia de control de los gránulos al 2,5% de KBPF-004 obtenidos en el Ejemplo <4-1> cuando se aplicaron como tratamiento a los suelos, se liofilizó y se molió una planta de tabaco infectada por el virus del mosaico del tabaco para preparar una fuente infectada. Se mezcló 1 g de la fuente infectada obtenida de ese modo con 100 g de suelos de lecho para preparar los suelos enfermos. A continuación, se mezcló bien 1 g de los gránulos al 2,5% de KBPF-004 con 100 g de los suelos enfermos, y se trasplantó a los mismos la planta anfitriona con la lesión local, tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc) de la fase foliar de tres hojas y se cultivó en un invernadero durante 3 semanas.

Como se muestra en la Tabla 17 y en la Fig. 9, las plántulas de tabaco se marchitaron en el grupo no tratado, pero crecieron bien como plantas sanas en el grupo tratado con gránulos al 2,5% de KBPF-004.

<Tabla 17>

Grupo	Cantidades de tratamiento/suelo	Tasa de plantas enfermas (%)				Diferencia significativa (DMRT)		Valor de control (%)
		A	B	C	promedio			
Gránulos al 25% de KBPF-004	1 g/100 g	2,3	3,2	3,4	3,0	a		93,3
No tratado	-	43,2	39,3	51,8	44,8		b	
* Coeficiente de variación (CV): 18,4%								

#### <6-6> Evaluación de la eficacia en el campo sobre el virus del rizado amarillo del tomate

- 5 Se mezcló una dilución de 1:500 de la SA al 70% de KBPF-004 obtenida en el Ejemplo <4-5> con insecticidas convencionales, tales como Dinotefurano<sup>®</sup> PM, Dinotefurano<sup>®</sup> GA, Espiromesifeno<sup>®</sup> CS, Diclorvos<sup>®</sup> CE y Amitraz + buprofezina CE, y la mezcla se pulverizó a las plantas de tomate. El valor de control resultante fue de 99,9%. En contraste, cuando se pulverizaron alternativamente Espinosad GA, Acetamiprid PM, Dinotefurano GA, Espiromesifeno CS, y benzoato de emamectina CE a las plantas, a intervalos de 7 días, la tasa de plantas enfermas calculada fue de 80,2%.

<Tabla 18>

Grupo	Tasa de dilución	Tasa de plantas enfermas (%)				Diferencia significativa (DMRT)		Valor de control (%)
		A	B	C	Promedio			
SA al 70% de KBPF-004	1:500	0,2	0,1	0,1	0,1	a		99,9
Insecticidas convencionales	-	77,6	74,5	88,4	80,2		b	
* Coeficiente de variación (CV): 18,4%								

**Listado de secuencias**

	<110>	LEE, YONG JIN
5	<120>	Cepa de Pseudomonas oleovorans para controlar enfermedades virales de plantas
	<130>	463.109537
	<140>	EP09830560.0
10	<141>	01-12-2009
	<150>	KR2008-120899
	<151>	02-12-2008
15	<150>	PCT/KR2009/007098
	<151>	01-12-2009
	<160>	1
20	<170>	KopatentIn 1.71
	<210>	1
	<211>	1479
	<212>	ADN
25	<213>	Pseudomonas oleovorans
	<400>	1

# ES 2 429 965 T3

tggcggcagg cctaacacat gcaagtcgag cggatgagag gagcttgctc ctcgattcag	60
cggcggacgg gtgagtaatg cctaggaatc tgcctagtag tgggggacaa cgtttcgaaa	120
ggaacgctaa taccgcatac gtcctacggg agaaagtggg ggatcttcgg acctcacgct	180
attagatgag cctaggtcgg attagctagt tggtagggta aaggcctacc aaggcgacga	240
tccgtaactg gtctgagagg atgatcagtc acactggaac tgagacacgg tccagactcc	300
tacgggagggc agcagtgggg aatattggac aatggggcga agcctgatcc agccatgccg	360
cgtgtgtgaa gaaggccttc ggggttgtaa gcactttaag ttggggaggaa gggcttacag	420
cgaatacctg tgagttttga cgttaccgac agaataagca cgggctaact tcgtgccagc	480
agccgcggta atacgaaggg tgcaagcgtt aatcggaatt actgggcgta aagcgcgcgt	540
aggtggccttg ataagttgga tgtgaaatcc cggggctcaa cctgggaact gcattcaaaa	600
ctgtctggct agagtgtggg agagggtagt ggaatttcca gtgtagcggg gaaatgcgta	660
gatattggaa ggaacaccag tggcgaaggc gactacctgg actaacactg acactgaggt	720
gcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatgt	780
caactagccg ttgggaccc tggagatcta gtggcgacgc taacgcatta agttgaccgc	840
ctggggagta cggccgcaag gttaaaactc aaatgaattg acggggggccc gcacaagcgg	900
tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt acctggcctt gacatgctga	960
gaactttcca gagatggatt ggtgccttcg ggaactcaga cacagggtgt gcattggctgt	1020
cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgtaa cgagcgcaac ccttgctcct	1080
agttaccagc acgttatggg gggcactcta aggagactgc cggtgacaaa ccggaggaag	1140
gtggggatga cgtcaagtca tcatggccct tacggccagg gctacacacg tgctacaatg	1200
gtcgggtacaa agggttgcc agccgcgagg tggagctaatt ccataaaac cgatcgtagt	1260
ccggatcgca gtctgcaact cgactgcgtg aagtcggaat cgctagtaat cgtgaatcag	1320
aacgtcacgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagtg	1380
ggttgctcca gaagtagcta gtctaacctt cgggaggacg gttaccacgg agtgattcat	1440
gactgggtga agtcgtaaca aggtagccgt aggggaacc	1479

# REIVINDICACIONES

1. Una cepa KBPF-004 de *Pseudomonas oleovorans* (KCTC 10159BP) que tiene actividad de control contra enfermedades virales de plantas.
2. Un cultivo de la cepa de *Pseudomonas oleovorans* de la reivindicación 1.
- 5 3. Un polvo seco del cultivo de la reivindicación 2.
4. El polvo seco de la reivindicación 3, en donde el polvo seco se prepara mediante liofilización o secado por pulverización.
5. Un agente microbiano para controlar enfermedades virales de plantas que comprende la cepa KBPF-004 de *Pseudomonas oleovorans* (KCTC 10159BP), un cultivo de la misma, o un polvo seco del cultivo como ingrediente activo.
- 10 6. El agente microbiano de la reivindicación 5, que comprende de 2,5 a 70% en peso de la cepa de *Pseudomonas oleovorans*, un cultivo de la misma, o un polvo seco del cultivo; de 2 a 30% en peso de un agente tensioactivo; y una cantidad residual de un vehículo.
7. El agente microbiano de la reivindicación 6, en donde el tensioactivo es un tensioactivo aniónico, un tensioactivo no iónico, o una mezcla de los mismos.
- 15 8. El agente microbiano de la reivindicación 6, en donde el vehículo se selecciona del grupo que consiste en bentonita, talco, arcilla, caolín, carbonato de calcio, sílice, piedra pómez, tierra de diatomeas, arcilla ferruginosa y calcárea blanca ácida, zeolita, perlita, hulla blanca, sulfato de amonio, urea, glucosa, dextrina, agua, y una mezcla de los mismos.
- 20 9. El agente microbiano de la reivindicación 5, que está en una forma seleccionada del grupo que consiste en polvos mojables (PM), gránulos dispersables en agua (GA), productos concentrados en suspensión (CS), gránulos, suspensiones acuosas (SA), polvos solubles (PS), gránulos solubles en agua (GA) y cápsulas.
10. El agente microbiano de la reivindicación 5, en donde la enfermedad viral vegetal es causada por un grupo de virus vegetales seleccionado del grupo que consiste en Alexivirus, Alfamovirus, Ampelovirus, Bimovirus, Begomovirus, Capilovirus, Carlavirus, Carmovirus, Caulimovirus, Closterovirus, Comovirus, Cucumovirus, Crinivirus, Citorabdomovirus, Fabavirus, Flexiviridae, Foveavirus, Furovirus, Geminivirus, Hordeivirus, Ilarivirus, Luteovirus, Maculavirus, Nepovirus, Potexvirus, Potivirus, Fitoreovirus, Polerovirus, Pomovirus, Sadwavirus, Taastropvirus, Tenuivirus, Tobamovirus, Tobravirus, Tombusvirus, Tospovirus, Tricovirus y una combinación de los mismos.
- 25

**FIG. 1**

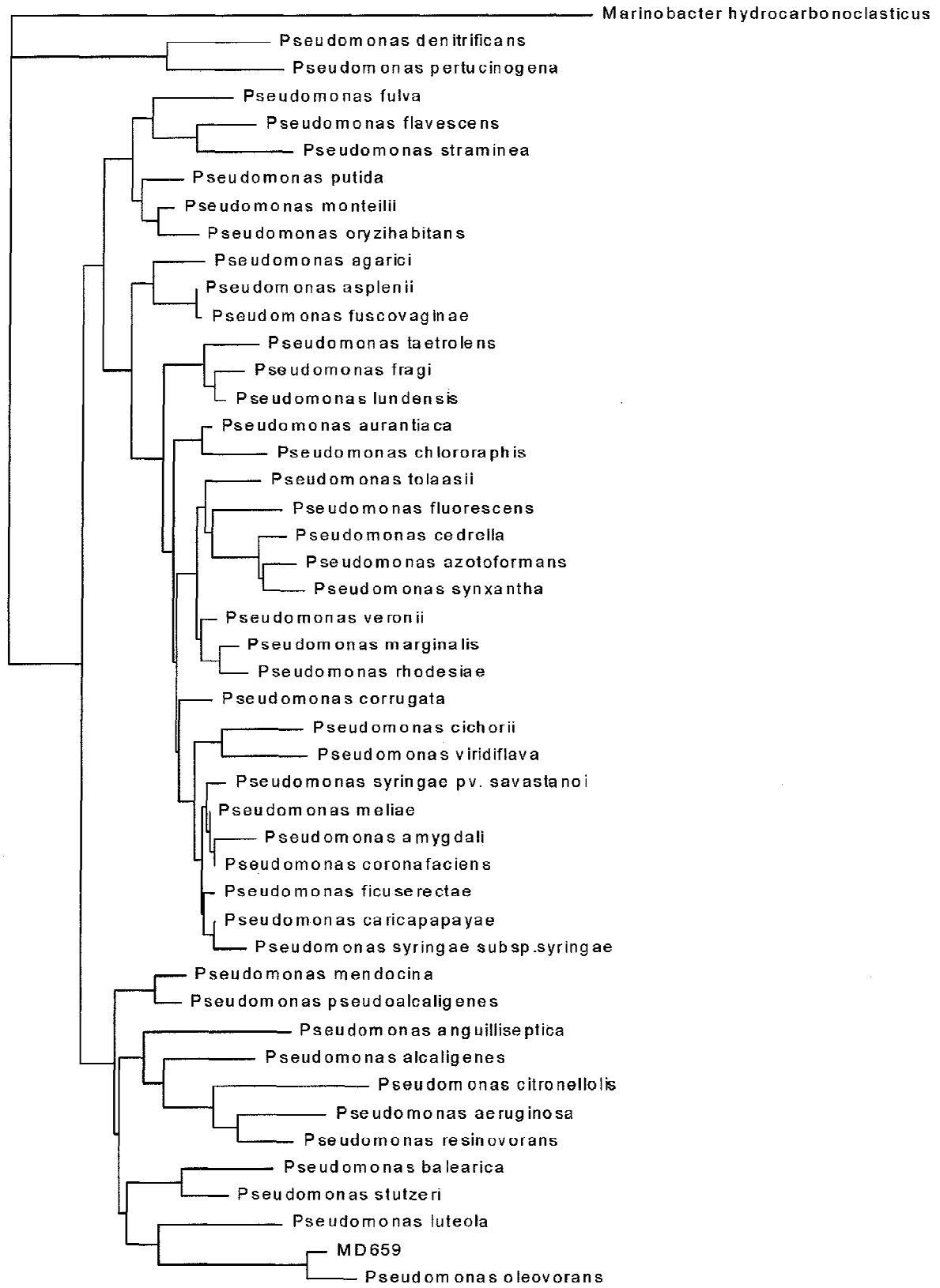


FIG. 2

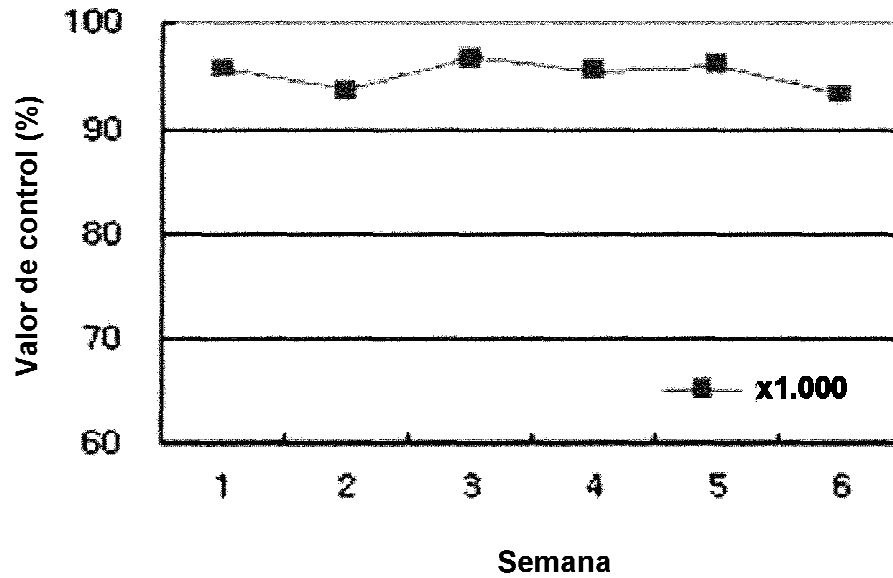
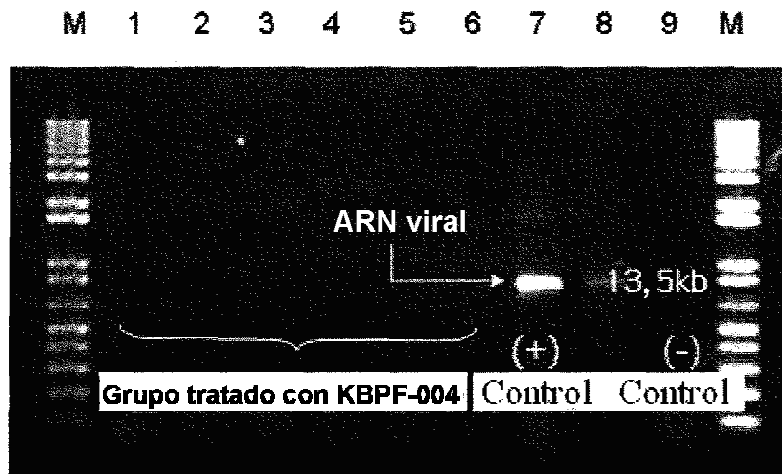


FIG. 3



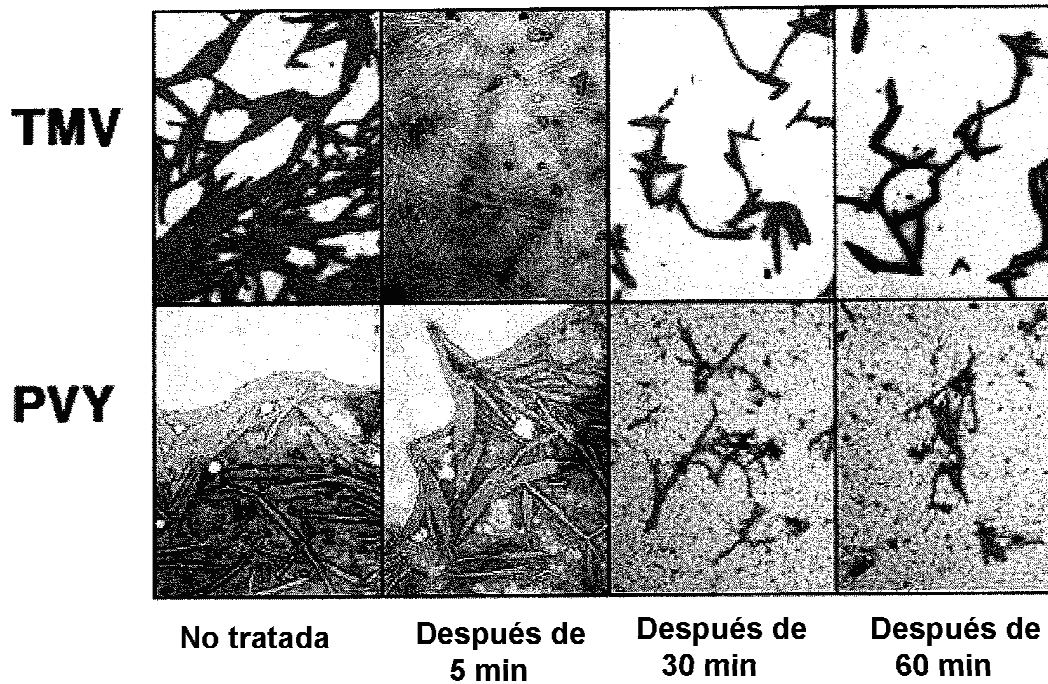
M: Escalera 1kb plus  
 1: KBPF-004A 0,02g/ml  
 2: KBPF-004A 0,005g/ml  
 3: KBPF-004B 0,01g/ml  
 7: Simulado  
 9: Planta sana (-)

2: KBPF-004A 0,01g/ml  
 4: KBPF-004B 0,02g/ml  
 6: KBPF-004B 0,005g/ml  
 8: TMV-ul(+)

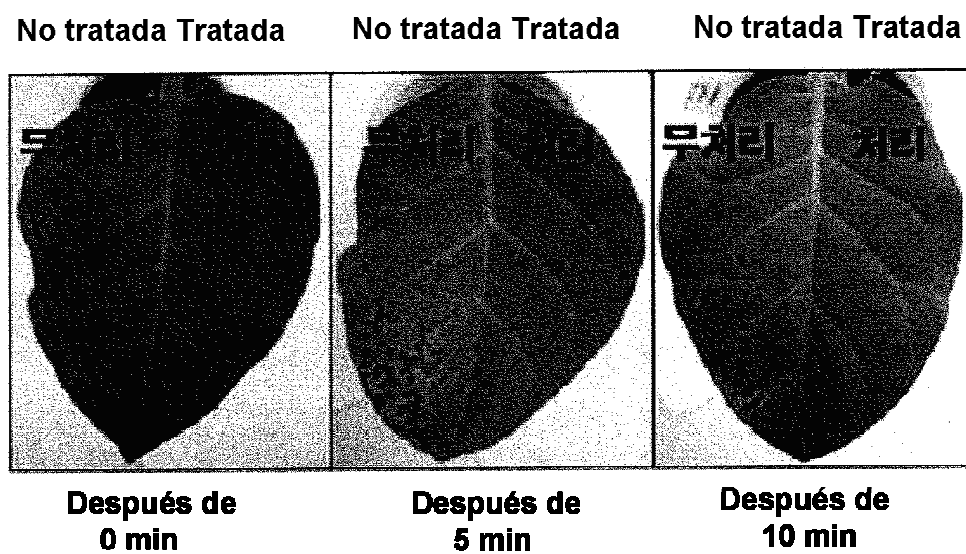
FIG. 4

Días de infección con virus	10						20						30						40					
Especie	C			D			C			D			C			D			C			D		
Tratamiento	M	H	N	1	2	H	N	1	2	N	1	2	N	1	2	N	1	2	N	1	2	N	1	2
PepMoV																								
PepMoV + PMMoV																								
PepMoV + CMV																								

**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**

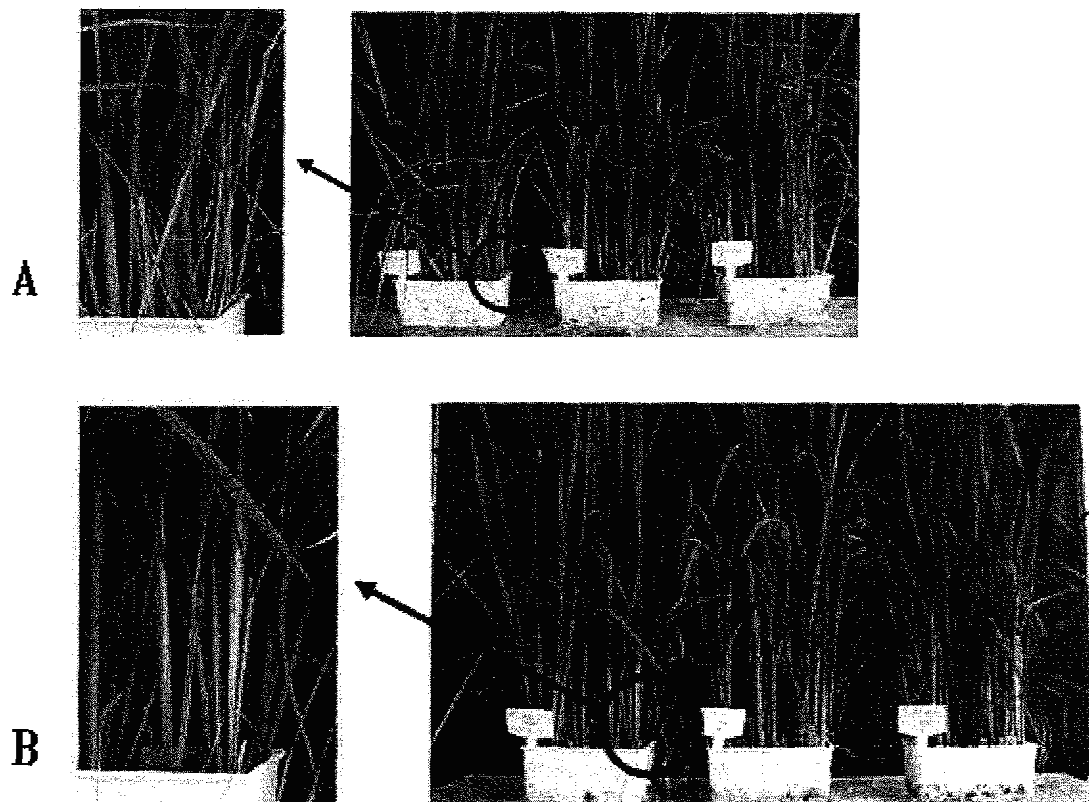


**Dilución 1:500  
KBPF-004**

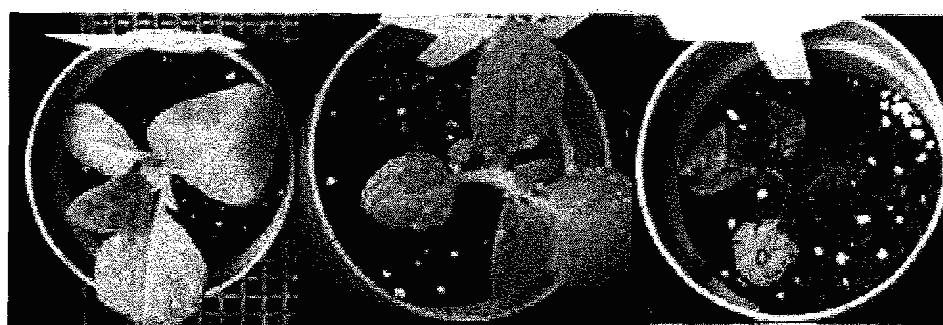
**Grupo no tratado**

**Dilución 1:1.000  
KBPF-004**

**FIG. 8**



**FIG. 9**



**Planta sana**

**Grupo tratado con  
gránulos al 2,5%  
de KBPF-004**

**Grupo no tratado**

**FIG. 10A**



**FIG. 10B**

