

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 558**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A01M 1/20** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)

**A01P 3/00** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2007 E 07831263 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2083070**

54 Título: **Microorganismo capaz de controlar enfermedades de las plantas y agente controlador de enfermedades de las plantas que utiliza el microorganismo**

30 Prioridad:

**08.11.2006 JP 2006302263**

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

**21.11.2013**

73 Titular/es:

**NIPPON SODA CO., LTD. (100.0%)  
2-1, Ohtemachi 2-chome Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8165, JP**

72 Inventor/es:

**MAEDA, MITSUNORI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 430 558 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

Microorganismo capaz de controlar enfermedades de las plantas y agente controlador de enfermedades de las plantas que utiliza el microorganismo

### Campo Técnico

- 5 La presente invención se refiere a un microorganismo que tiene capacidad de control contra enfermedades de las plantas, un agente controlador de enfermedades de las plantas que comprende una célula bacteriana del microorganismo, y un método para controlar enfermedades de las plantas que utiliza el microorganismo.

### Técnica Anterior

- 10 La presente solicitud reivindica prioridad basada en la Solicitud Japonesa No. 2006-302263 presentada el 8 de noviembre de 2006.

15 Convencionalmente, se utilizan contra enfermedades de las plantas agentes de cobre inorgánicos u orgánicos, y antibióticos tales como kasugamicina, estreptomycin y oxitetraciclina en diversas cosechas agrícolas y hortícolas. Adicionalmente, el ácido oxalínico fue registrado en 1989 como un agente sintético antibacteriano, y ha contribuido en gran parte al aumento de la producción de las cosechas. Sin embargo, los agentes de cobre inorgánicos y orgánicos tienden a causar daños a las cosechas agrícolas y hortícolas, por lo que las cosechas de temporización y cosechas diana se ven restringidas en el uso de los agentes inorgánicos y orgánicos. Adicionalmente, los antibióticos tienen inconvenientes en el sentido de que, como resultado de la utilización continua de un antibiótico, el patógeno bacteriano adquiere resistencia al antibiótico. Asimismo, con respecto al ácido oxalínico, han aparecido recientemente bacterias resistentes, y su uso se ve restringido.

20 Por consiguiente, con objeto de resolver los problemas de daños en las cosechas y bacterias resistentes, se ha registrado un interés creciente en pesticidas biológicos como medio de sustitución de los fungicidas sintéticos convencionales o como medio a utilizar en combinación con los fungicidas sintéticos convencionales. Los pesticidas biológicos son ventajosos en el sentido de que causan muy poca contaminación ambiental, armonizan con el ecosistema, y son superiores en el efecto controlador en comparación con los fungicidas sintéticos convencionales.

25 Los conocidos como agente agroquímico microbiano utilizado para control de enfermedades bacterianas en cosechas agrícolas y hortícolas incluyen, por ejemplo, *Erwinia carotovora* no patógena, utilizada particularmente para control de la pudrición blanda bacteriana de los vegetales de hoja y raíz; y *Pseudomonas* sp. CAB-02 o *Trichoderma atroviride* utilizada particularmente para control de la pudrición bacteriana de los granos y el tizón bacteriano de las plantas jóvenes, que son enfermedades bacterianas contagiosas en las semillas del arroz.

30 Composiciones bactericidas para agricultura y horticultura que contienen tales microorganismos han sido desarrolladas y comercializadas. Adicionalmente, el documento de Patente 1 describe la cepa G7090 de *Pseudomonas fluorescens*, que tiene efecto controlador contra *Pseudomonas cichorii* que es una bacteria causante de las manchas bacterianas de la lechuga.

35 Validov et al. (*Journal of Applied Microbiology*, vol. 102, 2007, p. 461-470) describe que la cepa específica de *Pseudomonas rhodesiae* PCL1761 exhibe un biocontrol significativo de la pudrición del pie y la raíz del tomate (TFFR), causada por *Fusarium oxysporum f.sp. radicum-lycopersici* (For1).

40 Los productos agroquímicos microbianos, sin embargo, están direccionados generalmente sólo a un número restringido de enfermedades de las plantas y a menudo no ejercen efecto satisfactorio contra otras enfermedades de las plantas. Por ejemplo, *Erwinia carotovora* no patógena está direccionada sólo contra la pudrición blanda bacteriana de los vegetales de hoja y raíz. *Pseudomonas* sp. CAB-02 o *Trichoderma atroviride* están direccionadas únicamente contra enfermedades del arroz, y *Pseudomonas fluorescens* está direccionada únicamente contra las manchas bacterianas de la lechuga. Como tales, las enfermedades diana están restringidas y prácticamente no puede esperarse efecto alguno para otras enfermedades bacterianas. Adicionalmente, dado que *Erwinia carotovora* patógena está controlada por bacteriocina, que es una proteína antibacteriana producida por *Erwinia carotovora* no patógena, preocupa el hecho de que *Erwinia carotovora* no patógena pueda adquirir resistencia a la bacteriocina (v.g., referencia no de patente 1).

Referencia de Patente 1: Solicitud de Patente Japonesa Expuesta al Público No. 2001-247423

50 Referencia no de Patente 1: Control Biológico de Enfermedades de las Cosechas por microorganismos antagonistas, III-5, Control de la pudrición blanda bacteriana de los vegetales por *Erwinia carotovora* no patógena, Kumiai Chemical Industry Co. Ltd., 65-76: 2003

### Exposición de la Invención

Objeto a Resolver por la Invención

La presente invención se hizo teniendo en cuenta la situación arriba mencionada. El objeto de la presente invención es, por tanto, proporcionar un microorganismo que tiene una capacidad de control excelente contra diversas enfermedades de las plantas (en particular, la pudrición blanda bacteriana o las manchas bacterianas de los vegetales de hoja y raíz, el cancro de los cítricos, y el "shot hole" bacteriano de los melocotones), en tanto que producen menos carga en el ambiente y una posibilidad extremadamente baja de la aparición de una bacteria patógena resistente; un agente controlador de enfermedades de las plantas que comprende una célula bacteriana del microorganismo; y un método para controlar enfermedades de las plantas que comprende aplicar el agente controlador de enfermedades de las plantas a una planta y/o al suelo de cultivo de la misma.

#### Medios para Resolver el Objeto

10 A fin de resolver el objeto, los autores de la presente invención enfocaron su atención en microorganismos residentes de la lechuga y buscaron microorganismos que posean capacidad controladora contra las enfermedades de las plantas. Como resultado, los autores de la presente invención encontraron un microorganismo que tiene un efecto controlador excelente contra la pudrición blanda bacteriana de la lechuga. Se analizaron las propiedades micológicas y la secuencia de bases del gen 16SrDNA del microorganismo y se supuso que el microorganismo era una nueva cepa de *Pseudomonas rhodesiae*. La presente invención se realizó basados en el descubrimiento arriba indicado.

La presente invención se refiere a (1) *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 que posee actividad controladora contra una enfermedad de las plantas; (2) una variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912, en la que la variante posee actividad controladora contra una enfermedad de las plantas; (3) *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912, o una variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 de acuerdo con uno cualquiera de (1) o (2), en donde la enfermedad de las plantas es una o más enfermedades seleccionadas de cancro, "shot hole" bacteriano, pudrición blanda bacteriana, manchas bacterianas, manchas bacterianas negras, marchitamiento bacteriano, manchas necróticas de las hojas, necrosis del endocarpio, pudrición bacteriana de los granos, tizón bacteriano de las plantas jóvenes, tizón bacteriano de las hojas, manchas bacterianas, y pudrición negra; y (4) *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 o una variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 de acuerdo con uno cualquiera de (1) o (2), en donde la enfermedad de las plantas es una enfermedad en una planta causada por una o más bacterias patógenas seleccionadas del género *Xanthomonas*, el género *Erwinia*, el género *Pseudomonas*, el género *Ralstonia*, y el género *Burkholderia* de acuerdo con uno cualquiera de (1) o (2).

La presente invención se refiere adicionalmente a (6) un agente controlador de enfermedades de las plantas que contiene una célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* seleccionada del grupo constituido por una célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 de acuerdo con (2), y una célula bacteriana de una variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 de acuerdo con (3); y (8) el agente controlador de enfermedades de las plantas de acuerdo con (6), en donde la enfermedad de las plantas es una o más enfermedades de las plantas seleccionadas de cancro, "shot hole" bacteriano, pudrición blanda bacteriana, manchas bacterianas, manchas negras bacterianas, marchitamiento bacteriano, manchas necróticas de las hojas, necrosis del endocarpio, pudrición bacteriana de los granos, tizón bacteriano de las plantas jóvenes, tizón bacteriano de las hojas, manchas bacterianas, y pudrición negra.

La presente invención se refiere adicionalmente a (9) un método para controlar una enfermedad de las plantas, en donde *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912, o una variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3) se aplica a una planta y/o al suelo de cultivo de la planta.

#### Efecto de la Invención

Un agente controlador de enfermedades de las plantas y un método para controlar enfermedades de las plantas de la presente invención imponen una carga leve sobre el ambiente y exhiben una posibilidad extremadamente baja de que broten bacterias patógenas resistentes, así como retención de una actividad controladora excelente contra diversas enfermedades de las plantas durante un periodo de tiempo más largo. Adicionalmente, un agente controlador de enfermedades de las plantas de la presente invención es notablemente ventajoso comparado con los productos agroquímicos microbianos convencionales en el sentido de que ejerce un efecto excelente particularmente contra la pudrición blanda bacteriana, las manchas bacterianas o la pudrición negra de los vegetales de hoja y raíz, el cancro de los cítricos, y el "shot hole" bacteriano de los melocotones, entre las enfermedades de las plantas.

#### 50 Breve Explicación de los Dibujos

[Figura 1]

La Figura 1 muestra un dendrograma de la cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae* (*Pseudomonas rhodesiae*, FERM BP-10912) de la presente invención, que se preparó basados en la secuencia de nucleótidos del gen 16SrDNA.

**Modo óptimo de Realización de la Invención**

“Que tiene capacidad controladora contra una enfermedad de las plantas” significa en esta memoria que exhibe una acción antagonista contra la bacteria patógena de cualquiera de las enfermedades de las plantas. Un microorganismo de la presente invención previene o cura una enfermedad de las plantas causada por la bacteria patógena de la enfermedad de las plantas por ejercer una acción antagonista contra dicha bacteria patógena. Un microorganismo de la presente invención, sin embargo, es particularmente eficaz en la prevención de una enfermedad de las plantas.

“Previene una enfermedad de las plantas” se refiere en esta memoria a aquello que cuando una planta o suelo de la misma que no ha sido infectado con una bacteria patógena de una enfermedad de las plantas o no ha presentado síntoma alguno de ello se cultiva, sea en las condiciones preferidas más tratamiento con un microorganismo de la presente invención o sólo en las condiciones preferidas, la planta tratada con un microorganismo de la presente invención exhibe un grado más leve de enfermedad comparada con la planta sin tratar con un microorganismo de la presente invención. Adicionalmente, “cura una enfermedad de las plantas”, como se ha mencionado arriba, hace referencia al caso de que cuando una planta que ha sido infectada con la bacteria patógena de una enfermedad de las plantas y exhibe los síntomas de la misma se cultiva en las condiciones preferidas excepto que la planta se trata o no se trata con un microorganismo de la presente invención, una planta tratada con un microorganismo de la presente invención exhibe un grado más leve de enfermedad comparada con una planta sin tratar con un microorganismo de la presente invención.

“Exhibe un grado más leve de enfermedad” significa, por ejemplo, que la severidad (o tasa de aparición) de la enfermedad es baja y el valor preventivo es mayor que 0. Cuanto mayor es el valor preventivo, tanto más preferido es el mismo. Por tanto, en este caso, el valor preventivo de 30 o más es muy bueno, 50 o más es mejor, y 60 ó 70 o más es particularmente mejor.

Un microorganismo de la presente invención se ilustra por la cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae*, y sus variantes debido a sus mejores propiedades como agente controlador de las enfermedades de las plantas. La cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae* fue depositada a nivel nacional por la solicitante de la presente solicitud en fecha 12 de septiembre de 2006 en la Depositaria Internacional de Organismos de Patente (IPOD), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) bajo el número de acceso FERM P-21025, seguido por el Depósito Internacional en fecha 25 de septiembre de 2007 bajo el número de acceso internacional FERM BP10912. La cepa JCM11940 de *Pseudomonas rhodesiae* fue depositada en RIKEN, Ibaraki Institute, BioResource Center (3-1-1 Koyadai, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón) como JCM11940.

“Una variante de una determinada cepa X” en la presente memoria descriptiva abarca cualquier variante inducida por la cepa X, con tal que dicha variante tenga las mismas propiedades micológicas que las de una cierta cepa X y tenga capacidad de control contra las enfermedades de las plantas. La variación incluye una variación artificial causada por tal como un agente de variante química o ultravioleta, así como una variación existente naturalmente. Una variante de cierta cepa X se ilustra preferiblemente por aquellas variantes que tienen las mismas propiedades micológicas que las de una cierta cepa X con respecto a las propiedades descritas en la Tabla 1 más adelante y que tienen capacidad de control contra enfermedades de plantas.

La cepa de *Pseudomonas rhodesiae* 05057219 (FERM BP-10912) que se prefiere entre los microorganismos de la presente invención tiene las propiedades micológicas siguientes.

La cepa *Pseudomonas rhodesiae* 05057219 es una bacteria Gram-negativa en forma de bastoncillos que no forma esporas. La longitud total de su célula es 2,0 – 2,5 µm, la anchura total es 0,7 – 0,8 µm, y se observa motilidad. Forma una colonia circular lisa en un medio de agar de caldo y produce un pigmento fluorescente sobre un medio King B. Su crecimiento no se observa a 41°C. Es positiva respecto a actividad de catalasa, se oxida en el test OF, es negativa para la reducción de sales nitrato, negativa para producción de indol, negativa para actividad de ureasa, positiva para degradación de la gelatina, negativa para actividad de β-galactosidasa, y negativa para actividad de β-glucosidasa. Adicionalmente, en el test LOPAT es positiva para producción de levano, negativa para la pudrición del tubérculo de la patata, negativa para la respuesta hipersensible al tabaco, positiva para la actividad de oxidasa, y positiva para la degradación de la arginina. Es negativa para la asimilación de almidón. En cuanto a la asimilación de compuestos de carbono tales como azúcares y aminoácidos, es positiva para D-glucosa, positiva para L-arabinosa, positiva para D-manosa, positiva para D-manitol, positiva para N-acetil-D-glucosamina, negativa para maltosa, positiva para gluconato de potasio, positiva para ácido n-cáprico, negativa para ácido adípico, positiva para ácido dL-málico, positiva para citrato de sodio, negativa para acetato de fenilo, positiva para sacarosa, positiva para trehalosa, negativa para adonita, positiva para sorbitol, positiva para ácido butírico, positiva para ácido propiónico, y positiva para propilenglicol. El método de determinación y análogos para cada detalle son como se describe más adelante en los ejemplos.

Un microorganismo de la presente invención será suficiente si el mismo tiene capacidad de control contra al menos una enfermedad de las plantas, pero se prefiere que el mismo tenga actividad de control contra al menos una o más,

preferiblemente 2 o más, y más preferiblemente contra todas las enfermedades de las plantas seleccionadas de cancro, "shot hole" bacteriano, pudrición blanda bacteriana, manchas bacterianas, manchas negras bacterianas, marchitamiento bacteriano, manchas necróticas de las hojas, necrosis del endocarpio, pudrición bacteriana de los granos, tizón bacteriano de las plantas jóvenes, tizón bacteriano de las hojas, manchas bacterianas, y pudrición negra. Adicionalmente, se prefiere que un microorganismo de la presente invención, tenga especialmente capacidad de control contra una o más enfermedades de las plantas, preferiblemente dos o más, y más preferiblemente la totalidad de las enfermedades de las plantas de entre pudrición blanda bacteriana, manchas bacterianas, pudrición negra, cancro y "shot hole" bacteriano.

Ejemplos de la bacteria patógena de estas enfermedades de las plantas incluyen tales como uno o más bacterias patógenas pertenecientes al género *Xanthomonas*, género *Erwinia*, género *Pseudomonas*, género *Ralstonia*, y género *Burkholderia*. Si bien se muestran detalles adicionales en la Tabla 1, las bacterias patológicas relacionadas con la presente invención no están limitadas a éstas.

[Tabla 1]

Enfermedad de las plantas	Bacteria patógena	Ejemplos de plantas diana
Cancro	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Citri</i>	Cítricos
"Shot hole" bacteriano	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i>	Melocotón, etc.
Pudrición blanda bacteriana	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Hortalizas hojosas tales como lechuga y col china; hortalizas de raíz tales como rábano japonés y patatas; flores tales como girasol, orquídea y ciclamen
Manchas bacterianas	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i>	Pepino, etc. rábano japonés
Manchas bacterianas de las hojas	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	Rábano japonés, col china
Manchas bacterianas negras	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Tomate
Marchitamiento bacteriano	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Tomate, berenjena, pimiento, etc.
Manchas necróticas de las hojas	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i>	Pepino, etc.
Necrosis del endocarpio	<i>Pseudomonas corrugata</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Tomate, berenjena, etc.
Pudrición bacteriana de los granos	<i>Burkholderia glumae</i>	Arroz
Tizón bacteriano de las plantas jóvenes	<i>Burkholderia plantarii</i>	Arroz
Tizón bacteriano de las hojas	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Arroz
Manchas bacterianas	<i>Pseudomonas cichorii</i> <i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	Lechuga, col china, col, etc.
Pudrición negra	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Col, etc.

Una planta aplicable para un microorganismo de la presente invención no está limitada particularmente con tal que el microorganismo de la presente invención pueda ejercer capacidad controladora para dicha planta. Ejemplo de las plantas aplicables incluyen una planta perteneciente a Brasicáceas, Solanáceas, Cucurbitáceas, Liliáceas, Fabáceas, Compuestas, Quenopodiáceas, Poáceas, Rosáceas, Cariofiláceas, Primuláceas, Rutáceas, Vitáceas, Actinidiáceas, Ebenáceas, Actinidiáceas, Convolvuláceas, o Aráceas. Como ejemplos preferibles entre éstas pueden citarse una planta perteneciente a las Brasicáceas, tal como la col china, una planta perteneciente a las Compuestas tal como la lechuga, una planta perteneciente a las Solanáceas tal como la patata, una planta perteneciente a las Rutáceas tal como limón y naranja nável, y una planta perteneciente a las Rosáceas tal como el melocotón.

<2> Agentes controladores de enfermedades de las plantas de la presente invención

Un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención no está limitado particularmente con tal que contenga la célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* de la presente invención. Una cepa de *Pseudomonas rhodesiae* de la presente invención que está contenida en un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención puede ser de un tipo o de dos o más tipos.

- 5 Un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención previene o cura una enfermedad de las plantas causada por una bacteria patógena de una enfermedad de las plantas por el proceso de que la célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* de la presente invención contenida en el agente controlador ejerce una acción antagonista contra la bacteria patógena. Un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención puede utilizarse como un agente preventivo de las enfermedades de las plantas o como un agente terapéutico de las enfermedades de las plantas, donde el mismo es especialmente eficaz como agente preventivo de las enfermedades de las plantas.

- 15 *Pseudomonas rhodesiae* adquiere principalmente una forma de trofocito, pero la célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* de la presente invención puede adquirir cualquier forma celular (v.g., célula durmiente) que pueda adoptar la bacteria viable de *Pseudomonas rhodesiae* tal como trofocito de *Pseudomonas rhodesiae*. Adicionalmente, una forma de la célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* a utilizar para un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención puede ser de un solo tipo o de más de dos tipos.

- 20 La célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* utilizada por un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención se obtiene, por ejemplo, por cultivo de *Pseudomonas rhodesiae* de la presente invención que ha sido aislada y obtenida utilizando como índice la secuencia del gen 16SrDNA de la cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae* (FERM BP10912) (véase SEQ ID NO. 1) y/o las propiedades micológicas arriba mencionadas de la cepa. Un método para cultivar *Pseudomonas rhodesiae* de la presente invención no está limitado particularmente, con indiferencia del tipo de medio o las condiciones de cultivo, con tal que el mismo sea un método en el cual pueda proliferar la célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae*. Cuando se emplea un cultivo sólido, se ilustra un método en el cual el cultivo estacionario se lleva a cabo a 20-35°C utilizando un método de agar estándar, agar nutriente, medio de agar patata-dextrosa, etc., y cuando se emplea un cultivo líquido, se ilustra un método en el cual se lleva a cabo cultivo con agitación mediante sacudidas/removido a 20-35°C utilizando diversos medios líquidos, etc. en los cuales el agar se ha separado de los medios de agar arriba mencionados.

- 30 En cuanto a la célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae*, puede utilizarse cualquier forma de célula tal como la célula bacteriana per se de *Pseudomonas rhodesiae*, una suspensión que contenga la célula bacteriana, una solución de cultivo que contenga la célula bacteriana, y un concentrado, pasta, sustancia seca o dilución de éstas (a las que puede hacerse referencia en lo sucesivo como "célula bacteriana y análogas de *Pseudomonas rhodesiae*") para un agente controlador de enfermedades de las plantas de la presente invención.

- 35 La concentración de una célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* contenida en un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención no está limitada particularmente con tal que el efecto de la presente invención no se vea afectado. Cuando un agente controlador de las enfermedades de las plantas se diluye hasta 1000-200 veces, se ilustra preferiblemente una concentración comprendida en un intervalo de  $1 \times 10^2$ - $1 \times 10^{11}$  cfu/ml, preferiblemente  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^9$  cfu/ml, en términos de concentración de células bacterianas.

- 40 Un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención puede contener componentes opcionales distintos de la célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* de la presente invención, con tal que el efecto de la presente invención no se vea afectado. No existe limitación particular alguna para el componente opcional con tal que el efecto de la presente invención no se vea afectado, y ejemplos de ellos incluyen un portador, agente tensioactivo, dispersante y suplemento. Adicionalmente, pueden añadirse un antioxidante, colorante, lubricante, absorbedor ultravioleta, agente antiestático y agente antiséptico de acuerdo con las necesidades.

- 45 Ejemplos del portador incluyen sales inorgánicas tales como carbonato de calcio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, sulfato de calcio, sulfato de amonio; ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido málico y ácido esteárico, y sales de los mismos; azúcares tales como glucosa, lactosa y sacarosa; y un portador sólido tal como polvo de alúmina, gel de sílice, zeolita, hidroxapatita, fosfato de circonio, fosfato de titanio, óxido de titanio, óxido de cinc, hidrotalcita, caolinita, montmorillonita, talco, arcilla, diatomita, bentonita, carbono blanco, caolín y vermiculita.

- 50 Adicionalmente, el agente tensioactivo (que puede utilizarse también como dispersante) no está limitado particularmente con tal que el mismo pueda utilizarse para formulaciones agrícolas y hortícolas ordinarias, y los ejemplos específicos incluyen un agente tensioactivo no iónico, agente tensioactivo aniónico, agente tensioactivo catiónico y agente tensioactivo anfótero, como se describe más adelante.

- 55 Ejemplos del agente tensioactivo no iónico incluyen un agente tensioactivo de éster de azúcar, tal como un éster de ácido graso de sorbitán (C<sub>12-18</sub>), POE-éster de ácido graso de sorbitán (C<sub>12-18</sub>), y éster de ácido graso de sacarosa; un agente tensioactivo de éster de ácido graso tal como POE-éster de ácido graso (C<sub>12-18</sub>), POE-éster de ácido resínico, POE-diéster de ácido graso (C<sub>12-18</sub>); un agente tensioactivo de alcohol tal como POE-alquiléter (C<sub>12-18</sub>); un agente tensioactivo de alquilfenol tal como POE-alquil (C<sub>8-12</sub>)-feniléter; POE-dialquil (C<sub>8-12</sub>)-feniléter y condensado

POE-alquil (C<sub>8-12</sub>)-feniléter-formalina; polímero de bloques polioxietileno-polioxipropileno; un agente tensioactivo de polímero de bloques polioxietileno-polioxipropileno tal como éter de polímero de bloques alquil (C<sub>12-18</sub>) polioxietileno-polioxipropileno; un agente tensioactivo de alquilamina tal como POE-alquilamina (C<sub>12-18</sub>) y POE-amida de ácido graso (C<sub>12-18</sub>); un agente tensioactivo de bisfenol tal como POE-ácido graso-bisfeniléter; un agente tensioactivo de anillo multi-aromático tal como POA-bencilfenil (o fenilfenil)-éter y POA-estirilfenil (o fenilfenil)-éter; un agente tensioactivo de silicio o flúor tal como agentes tensioactivos de POE-éter y POE-éster-silicio y agente tensioactivo de flúor; un agente tensioactivo de aceite vegetal tal como POE-aceite de ricino y POE-aceite de ricino hidrogenado.

Ejemplos del agente tensioactivo aniónico incluyen un agente tensioactivo de tipo sulfato tal como alquilsulfato (C<sub>12-18</sub>, Na, NH<sub>4</sub>, alcanolamina), POE-alquiletersulfato (C<sub>12-18</sub>, Na, NH<sub>4</sub>, alcanolamina), POE-alquilfeniletersulfato (C<sub>12-18</sub>, NH<sub>4</sub>, alcanolamina), POE-bencil (o estiril)-fenil (o fenilfenil)-etersulfato (Na, NH<sub>4</sub>, alcanolamina), polímero de bloques polioxietileno-polioxipropileno-sulfato (Na, NH<sub>4</sub>, alcanolamina); un agente tensioactivo de sulfonato tal como parafina (alcano)sulfonato (C<sub>12-22</sub>, Na, Ca, alcanolamina), AOS (C<sub>14-16</sub>, Na, alcanolamina), dialquil-sulfosuccinato (C<sub>8-12</sub>, Na, Ca, Mg), alquilbenceno-sulfonato (C<sub>12</sub>, Na, Ca, Mg, NH<sub>4</sub>, alquilamina, alcohol, amina, ciclohexilamina), mono- o di-alquil (C<sub>3-6</sub>)naftaleno-sulfonato (Na, NH<sub>4</sub>, alcanolamina, Ca, Mg), condensado de naftaleno-sulfonato-formalina (Na, NH<sub>4</sub>), alquil (C<sub>8-12</sub>) difeniléter-disulfonato (Na, NH<sub>4</sub>), ligninsulfonato (Na, Ca), POE-alquil(C<sub>8-12</sub>) feniléter-sulfonato (Na), y semiéster POE-alquil ((C<sub>12-18</sub>) éter-ácido sulfosuccínico (Na)); un agente tensioactivo de fosfato tal como POE-alquil (C<sub>12-18</sub>) eterfosfato (Na, alcanolamina) que incluye una sal ácido carboxílico-ácido graso (C<sub>12-18</sub>, Na, K, NH<sub>4</sub>, alcanolamina), sarcosinato N-metil-ácido graso (C<sub>12-18</sub>, Na) y sal de ácido resínico (Na, K), POE-mono- o di-alquil (C<sub>8-12</sub>) feniléterfosfato (Na, alcanolamina), POE-fenil (o fenilfenil)eterfosfato bencilado (o estirilado) (Na, alcanolamina), polímero de bloques polioxietileno-polioxipropileno (Na, alcanolamina), fosfatidilcolina-fosfatidiletanolamina (lecitina), y alquil (C<sub>8-12</sub>) fosfato.

Ejemplos del agente tensioactivo catiónico incluyen un agente tensioactivo de amonio tal como cloruro de alquiltrimetilamonio (C<sub>12-18</sub>), cloruro de metil-polioxietileno-alquilamonio (C<sub>12-18</sub>), bromuro de alquil-N-metilpiridio (C<sub>12-18</sub>), cloruro de mono- o di-alquil (C<sub>12-18</sub>) amonio metilado, y dicloruro de alquil (C<sub>12-18</sub>) pentametilpropilendiamina; y un agente tensioactivo de benzalconio tal como cloruro de alquildimetilbenzalconio (C<sub>12-18</sub>), y cloruro de bencetonio (cloruro de octilfenoxietoxi-etildimetilbencilamonio).

Ejemplos de agente tensioactivo anfólitico incluyen un agente tensioactivo de betaína tal como dialquil (C<sub>8-12</sub>) diaminoetilbetaína y alquil (C<sub>12-18</sub>) dimetilbencilbetaína; un agente tensioactivo de glicina tal como dialquil (C<sub>8-12</sub>) diaminoetilglicina y alquil (C<sub>12-18</sub>) dimetilbencilglicina.

Un agente tensioactivo y/o un dispersante puede utilizarse solo o en combinación de dos o más clases de los mismos.

El suplemento puede ilustrarse por carboximetilcelulosa, polietilenglicol, goma arábica, y almidón.

La forma de un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención no está limitada particularmente, y el mismo puede presentar cualquier forma que pueda adquirir un agente agrícola y hortícola común. El agente controlador puede adquirir, por ejemplo, una forma de formulación de polvo, polvo humectable, emulsión, formulación capaz de fluir, y formulación granular.

Una enfermedad de las plantas a la cual puede aplicarse un agente controlador de las plantas de la presente invención no está limitada particularmente con tal que la enfermedad esté causada por infección de una planta se infecta con una bacteria patógena para la cual *Pseudomonas rhodesiae* de la presente invención ejerce su capacidad de control. Ejemplos de la enfermedad de las plantas aplicable incluyen cancro, "shot hole" bacteriano, pudrición blanda bacteriana, manchas bacterianas, manchas negras bacterianas, marchitamiento bacteriano, manchas necróticas de las hojas, necrosis del endocarpio, pudrición bacteriana de los granos, tizón bacteriano de las plantas jóvenes, tizón bacteriano de las hojas, manchas bacterianas, y pudrición negra.

Adicionalmente, ejemplos de la enfermedad de las plantas a la cual puede aplicarse un agente controlador de las plantas de la presente invención incluyen una o más enfermedades de las plantas, preferiblemente dos o más enfermedades de las plantas, y más preferiblemente la totalidad de las enfermedades de las plantas seleccionadas de cancro, "shot hole" bacteriano, pudrición blanda bacteriana, manchas bacterianas, manchas negras bacterianas, marchitamiento bacteriano, manchas necróticas de las hojas, necrosis del endocarpio, pudrición bacteriana de los granos, tizón bacteriano de las plantas jóvenes, tizón bacteriano de las hojas, manchas bacterianas, y pudrición negra. Se ilustran particularmente al menos una o más enfermedades de las plantas, preferiblemente dos o más enfermedades de las plantas, y más preferiblemente la totalidad de las enfermedades de las plantas seleccionadas de pudrición blanda bacteriana, manchas bacterianas, pudrición negra, cancro y "shot hole" bacteriano.

<3> Método para controlar enfermedades de las plantas de acuerdo con la presente invención

Un método para controlar las enfermedades de las plantas de acuerdo con la presente invención no está limitado particularmente con tal que el mismo sea un método que comprende tratar una planta y/o el suelo de cultivo de la

misma con un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención, y puede seleccionarse adecuadamente dependiendo de factores tales como el tipo de la enfermedad de las plantas y el tipo de la planta aplicable de manera similar a cuando se utilizan pesticidas químicos ordinarios. Por ejemplo, una planta puede tratarse con un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención por aplicación directa o pulverización con un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención. Alternativamente, el suelo en el que se cultiva la planta (suelo de cultivo de la planta) puede tratarse con un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención, por ejemplo por mezcla, pulverización o riego con un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención. En esta memoria, cuando un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención se trata en el suelo de cultivo de una planta, la planta puede plantarse después que el suelo se ha tratado con un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención, o el suelo puede tratarse con un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención después que la planta ha sido plantada en el suelo. Adicionalmente, como se describe en la Solicitud de Patente Japonesa Expuesta al Público No. 2001-302407, un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención puede situarse en la proximidad de la abertura de soplado de una soplante para soplar aire en el lugar apropiado y el agente agroquímico se dispersa junto con el aire soplado desde la abertura de soplado.

Cuando se trata una planta y/o el suelo de cultivo de la misma con un agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención, el agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención puede utilizarse por dilución del mismo con una cantidad apropiada de agua y análogos. La cantidad de agente controlador de las enfermedades de las plantas de la presente invención a tratar para una planta y/o el suelo de cultivo de la misma no puede definirse generalmente, dado que la cantidad difiere dependiendo del tipo de enfermedad de la planta, el tipo de la planta aplicable, etc. Cuando el agente controlador se pulveriza en el suelo, la cantidad puede definirse usualmente de modo que esté comprendida en un intervalo de  $1 \times 10^2$ - $1 \times 10^{11}$  cfu/ml, preferiblemente  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^9$  cfu/ml, en términos de la concentración de células bacterianas de *Pseudomonas rhodesiae*.

El número de tratamientos de pulverización puede seleccionarse adecuadamente de acuerdo con el tipo de enfermedad de la planta, el tipo de la planta aplicable, y la severidad de la enfermedad.

La presente invención se ilustra con mayor detalle en lo que sigue; sin embargo, el alcance técnico de la presente invención no debe considerarse limitado a estos ejemplos.

## 30 EJEMPLOS

[Ejemplo 1]

Identificación de las bacterias y preparación de una composición de polvo humectable controlador de las enfermedades de las plantas

1. Selección de una cepa que tiene capacidad de control contra la pudrición blanda bacteriana de la lechuga

35 Hojas de lechuga recogidas en el campo de una granja se homogeneizaron en una pequeña cantidad de agua esterilizada. La suspensión así obtenida se aplicó en forma de capa sobre un agar de método estándar (0,5% (p/v) caseína-peptona, 0,25% (x/v) extracto de levadura, 0,1% (w/v) glucosa, 1,5% (p/v) agar, pH 6,9-7,1 después de la esterilización) (NISSUI PHARMACEUTICAL CO. LTD.) y se cultivó durante 2 días a 25°C. Se recogieron colonias de los microorganismos que crecieron, las cuales se separaron ulteriormente y se obtuvieron como una sola colonia. 40 Las cepas plurales de los microorganismos así obtenidos se sometieron a un test para evaluación del efecto controlador contra la pudrición blanda bacteriana de la lechuga (test de interior), como se describe en los Ejemplos que siguen, para selección de cepas de microorganismos que tienen efecto controlador contra una cepa patógena de la pudrición blanda bacteriana de la lechuga (*Erwinia carotovora*). Las cepas así seleccionadas se sometieron ulteriormente a un test para evaluación del efecto controlador contra la pudrición blanda bacteriana de la lechuga (ensayo en campo) de manera similar al test últimamente mencionado para evaluación del efecto controlador contra la pudrición blanda bacteriana en la col china (ensayo en campo). Como resultado, se seleccionó la cepa 05057219 que ejercía un efecto controlador contra la pudrición blanda bacteriana de la lechuga también en el test de campo.

2. Análisis del gen 16SrDNA

Con objeto de analizar la secuencia de nucleótidos del gen 16SrDNA en la cepa 05057219, se intentó aislar 16SrDNA de la cepa 05057219. Específicamente, se aisló el DNA genómico de la cepa 05057219 de acuerdo con un protocolo común. Utilizando el DNA genómico así obtenido como molde, se llevó a cabo una amplificación PCR utilizando el cebador 27F (SEQ ID NO. 2) y el cebador 1544R (SEQ ID NO. 3) que son cebadores utilizados comúnmente para aislar 16SrDNA. Después que se hubo confirmado la presencia o ausencia de los productos PCR por electroforesis utilizando gel de agarosa, se secuenciaron cada uno de los productos PCR con inclusión de tipos plurales de polinucleótidos, y se determinaron los tipos plurales de secuencias de nucleótido. Se llevó a cabo un ensamblaje basado en la información de tipos plurales de secuencias de nucleótidos así obtenidos a fin de

determinar la secuencia de nucleótidos de longitud total de 16SrDNA. La secuencia de nucleótidos del gen 16SrDNA de la cepa 05057219 se muestra más adelante como SEQ ID NO. 1.

Se realizó una investigación de homología BLAST basada en la secuencia de nucleótidos del gen 16SrDNA de la cepa 05057219. Adicionalmente, la secuencia de nucleótidos del gen 16SrDNA de la cepa 05057219 se analizó con ClustalW, y los resultados del análisis así obtenidos se procesaron utilizando Tree View para producir un dendrograma de la cepa 05057219 (Figura 1). El dendrograma demostró la posición taxonómica de la cepa 05057219. Como resultado, se sugirió fuertemente que la cepa 05057219 es muy probablemente *Pseudomonas rhodesiae*.

3. Análisis de las propiedades bacterianas.

10 Los resultados del análisis de secuencia para el gen 16SrDNA en el punto "2." anterior sugirieron que la cepa 05057219 es con gran probabilidad un microorganismo perteneciente al género *Pseudomonas*, siendo especialmente *Pseudomonas rhodesiae* o *Pseudomonas fluorescens*. Con objeto de determinar la especie de la cepa 05057219, se examinaron sus propiedades micológicas por el método dado que se describe más adelante. Las propiedades bacterianas de la cepa 05057219 son las siguientes. Se trata de una bacteria Gram-negativa, en forma de bastoncillos, que no forma esporas. Su longitud de célula entera es 2,5-2,5 µm, la anchura total es 0,7-0,8 µm, y se observa motilidad. La misma forma una colonia circular lisa en un medio de agar de caldo y produce pigmento fluorescente en un medio King B. Su crecimiento no se observa a 41°C. Es positiva respecto a actividad de catalasa, se oxida en el test OF, negativa para reducción de las sales nitrato, negativa para producción de indol, negativa para actividad de ureasa, positiva para degradación de gelatina, negativa para actividad βe -galactosidasa, y negativa para actividad de β-glucosidasa. Adicionalmente, en el test LOPAT, la misma es positiva para la producción de levano, negativa para la pudrición del tubérculo de patata, negativa para la respuesta hipersensible al tabaco, positiva para actividad de oxidasa, y positiva para la degradación de arginina. La misma es negativa para asimilación de almidón. En cuanto a la asimilación de compuestos de carbono tales como azúcares y ácidos orgánicos, la misma es positiva para D-glucosa, positiva para L-arabinosa, positiva para D-manosa, positiva para D-manitol, positiva para N-acetil-D-glucosamina, negativa para maltosa, positiva para gluconato de potasio, positiva para ácido n-cáprico, negativa para ácido adípico, positiva para ácido dL-málico, positiva para citrato de sodio, negativa para acetato de fenilo, positiva para sacarosa, positiva para trehalosa, negativa para adonita, positiva para sorbitol, positiva para ácido butírico, positiva para ácido propiónico, y positiva para propilenglicol. Estos resultados se resumen en la tabla siguiente.

30 [Tabla 2]

	Cepa 05057219 FERM BP-10912	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> (cepa JCM11940)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (cepa NRRC14160)
Forma de la célula	Bastoncillo	Bastoncillo	Bastoncillo
Forma de la colonia	Circular lisa	Circular lisa	Circular lisa
Tinción Gram	-	-	-
Formación de esporas	-	-	-
Motilidad	+	+	+
Crecimiento a 41°C	-		
Actividad de catalasa	+		
Test OF	Oxidación	Oxidación	Oxidación
Test en medio King B	+		
Reducción de la sal nitrato	-	+	-
Producción de indol	-	-	-
Actividad de ureasa	-	-	-
Degradación de gelatina	+	+	-
Actividad de β-galactosidasa			

Actividad de $\beta$ -glucosidasa	-	-	-
Actividad de levano	+	+	+
Pudrición del tubérculo de patata	-		
Respuesta hipersensible al tabaco	-		
Actividad de oxidasa	+	+	+
Degradación de arginina	+	+	-
(Asimilación)			
Almidón	-	-	-
D-glucosa	+	+	+
L-arabinosa	+	+	+
D-manosa	+	+	+
D-manitol	+		
N-acetil-D-glucosamina	+	+	+
Maltosa	-	-	-
Gluconato de potasio	+	+	+
Ácido n-cáprico	+	+	+
Ácido adípico	-	-	-
Ácido dL-málico	+	+	+
Citrato de sodio	+	+	+
Acetato de fenilo	-	-	-
Sacarosa	+	+	-
Trehalosa	+	+	+
Adonita	-	-	+
Sorbitol	+	+	+
Ácido butírico	+	+	-
Ácido propiónico	+	+	-

Entre los detalles de la Tabla 2 anterior, se utilizó API20NE (BioMerieux Japan Ltd.) y el test se realizó de acuerdo con el protocolo adjunto para reducción de la sal nitrato, producción de indol, test OF, degradación de arginina, actividad de ureasa, degradación de gelatina, actividad de  $\alpha$ -galactosidasa, actividad de  $\beta$ -glucosidasa, asimilación de D-glucosa, asimilación de L-arabinosa, asimilación de D-manosa, asimilación de D-manitol, asimilación de N-acetil-D-glucosamina, asimilación de maltosa, asimilación de gluconato de potasio, asimilación de ácido n-cáprico, asimilación de ácido adípico, asimilación de ácido dL-málico, asimilación de citrato de sodio, y asimilación de acetato de fenilo. La actividad de oxidasa se testó utilizando el Reactivo Oxidasa (BioMerieux Japan Ltd.) y la actividad de catalasa se testó utilizando ID color Catalase (BioMerieux Japan Ltd.). Adicionalmente, un medio King B utilizado en el test del medio King B era de EIKEN CHEMICAL CO., LTD. La tinción Gram se realizó utilizando Color Gram 2 (BioMerieux Japan Ltd.). En el test de producción de levano, la cepa se transformó por aplicación en bandas sobre la placa plana de agar nutriente complementada con 5% de sacarosa, y se cultivó durante 3 días a 25°C. Aquéllas que formaban una colonia blanca y viscosa que se elevaba en forma de domo grande se definieron como positivas.

El test de la pudrición del tubérculo de patata se realizó como sigue.

- 5 Patatas peladas y cortadas en rodajas con un espesor de 7-8 mm se lavaron con agua y se impregnaron en alcohol, sometiéndose luego rápidamente a esterilización a la llama, después de lo cual se pusieron en cápsulas Petri y se mantuvieron en condiciones de exceso de humedad. Las secciones de patata cortadas en rodajas redondas se recubrieron con una solución bacteriana espesa y se cultivaron durante 2 días a 25°C. Aquellas secciones de patata en las cuales se habían podrido la mayor parte de las secciones inoculadas con bacterias se definieron como positivas, y aquellas secciones de patata en las cuales se había podrido sólo una pequeña parte del área inoculada se definieron como negativas. Este test se realizó utilizando la variedad "Tokachi-kogane" como patatas de test.

Un test de respuesta hipersensible para tabaco se realizó como sigue.

- 10 Se inyectó una solución bacteriana en el mesofilo del tabaco (White Burley o Bright Yellow) con una jeringuilla. Se utilizaron dos clases de soluciones bacterianas, a saber, soluciones bacterianas con la concentración de bacterias de  $1 \times 10^8$  células/ml y  $1 \times 10^9$  células/ml, respectivamente. Los tabacos inyectados con la solución bacteriana respectiva se cultivaron durante 5 días. Aquellos tabacos en los cuales la parte infiltrada con solución bacteriana había sufrido deshidratación y se había vuelto de color pardo o verde oscuro se definieron como positivas. Aquellos tabacos que no exhibían cambio alguno o que simplemente se volvían amarillentos se definieron como negativos.

- 15 El test de asimilación de almidón se realizó como sigue.

- 20 En primer lugar, se transfirió una cepa por aplicación en bandas sobre agar nutriente (que contenía 35 g de agar y 10 g de almidón soluble en 1 litro de agua), y se cultivaron durante 2 a 3 días a 30°C. Después del cultivo, se vertió solución de yodo Lugol (que contenía 0,1 g de yodo y 0,2 g de yoduro de potasio en 30 ml de agua) sobre el medio de agar arriba mencionado, y se definió como positivo cuando se observó una parte transparente alrededor de la colonia de bacterias.

- 25 La asimilación de compuestos de carbono tales como azúcares y ácidos orgánicos se testó como sigue. Se añadieron 5 ml de un medio basal cuya composición es como se describe a continuación con 0,1% en peso de 0,2% en peso de un compuesto de carbono (uno cualquiera de D-glucosa, sacarosa, trehalosa, adonita, sorbitol, ácido butírico, ácido propiónico y propilenglicol; 0,2% en peso para D-glucosa, sacarosa, trehalosa, adonita y sorbitol, y 0,1% en peso para ácido butírico, ácido propiónico y propilenglicol), a fin de preparar el medio. La célula bacteriana se inoculó sobre el medio así preparado y se cultivó durante 2 a 3 días (5 días para ácido butírico) a 30°C. Después del cultivo, se definió el mismo como positivo cuando se observó el crecimiento bacteriano.

Composición del medio basal (1 litro)

Tampón de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1M y $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1M (pH6,8)	40 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 g
Solución de sales inorgánicas de Hunter	20 ml
Agua destilada	El resto

- 30 Composición de la solución de sales inorgánicas de Hunter (1 litro)

Ácido nitrilotriacético	10 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14,45 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,335 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	9,25 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	99 mg
Solución stock de sales (Metales "44")	50 ml

El ácido nitrilotriacético se disolvió en agua destilada y se neutralizó con hidróxido de potasio, después de lo cual se añadieron a ello las otras sales.

Solución stock de sales (composición para 100 ml)

EDTA	250 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,095 mg

FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	500 mg
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	154 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	39,2 mg
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	24,8 mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	17,7 mg

Con objeto de demostrar si la cepa 05057219 es *Pseudomonas rhodesiae* o *Pseudomonas fluorescens*, se testaron cepas conocidas, la cepa JCM 11940 de *Pseudomonas rhodesiae* y la cepa NBRC14160 de *Pseudomonas fluorescens* en cuanto a los detalles incluidos en la Tabla 2 anterior de manera similar a lo que antecede. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Es sabido que *Pseudomonas fluorescens* es patógena para los tomates y causa necrosis del endocarpio del tomate. Así pues, con objeto de examinar si la cepa 05057219 exhibe dicha patogenicidad para los tomates o no, se realizó el test siguiente.

Se cultivó la cepa 05057219 en un medio líquido hasta que A<sub>600</sub> (absorbancia a la longitud de onda de 600 nm) alcanzó 1,0, y la solución de cultivo se inoculó por pulverización sobre la estipe principal y la parte del peciolo de la hoja que se centraba en la base del peciolo de las plantas jóvenes de tomate. Después de haberse cultivado durante 7 días, se observaron las plantas jóvenes y no había traza alguna de síntoma de necrosis en el endocarpio del tomate. Las plantas jóvenes se observaron también después de haber sido cultivadas respectivamente durante 14 días y 21 días, y no se apreciaba tampoco traza alguna de síntoma de necrosis del endocarpio del tomate. Adicionalmente, la solución de cultivo arriba mencionada de la cepa 05057219 se inoculó en plantas jóvenes de tomate en la parte que se había raspado y se realizó un test similar, pero tampoco se observó síntoma alguno de necrosis del endocarpio del tomate. Adicionalmente, se inoculó la solución de cultivo arriba mencionada de la cepa 05057219 por inyección en las plantas jóvenes de tomate utilizando una jeringuilla y se llevó a cabo un test similar. Análogamente, no se observó síntoma alguno de necrosis del endocarpio del tomate.

Los resultados de la Tabla 2 revelaban que la cepa 05057219 difería de la cepa NBRC14160 de *Pseudomonas fluorescens* con respecto a presencia o ausencia de degradación de la gelatina, degradación del ácido de arginina, asimilación de sacarosa, asimilación de adonita, asimilación de ácido propiónico, y asimilación de propilenglicol. Por otra parte, la cepa 05057219 difería de la cepa JCM11940 de *Pseudomonas rhodesiae* con respecto a la presencia o ausencia de capacidad de reducción para la sal nitrato.

Además, se observaron las formas de la célula bacteriana y se reveló que la cepa 05057219 (longitud total de la célula: 2,0-2,5 μm, anchura de la célula: 0,7-0,8 μm) y la cepa JCM11940 de *Pseudomonas rhodesiae* (longitud total de la célula: 2,0-2,5 μm, anchura de la célula: 0,7-0,8 μm) eran prácticamente del mismo tamaño, pero que la cepa NBRC14160 de *Pseudomonas fluorescens* (longitud total de la célula: 2,2-2,7 μm, anchura de la célula: 0,8-1,0 μm) era ligeramente mayor que la cepa 05057219 tanto en longitud como en anchura.

Además, al contrario que *Pseudomonas fluorescens*, la cepa 05057219 no causaba necrosis del endocarpio del tomate.

Partiendo de una revisión exhaustiva de los resultados anteriores, se consideró que la cepa 05057219 era mucho más homóloga a *Pseudomonas rhodesiae* que a *Pseudomonas fluorescens*. Por ello, se identificó la cepa 05057219 como *Pseudomonas rhodesiae*. Los autores de la presente invención designaron la cepa 05057219 como cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae*. *Pseudomonas rhodesiae* es un microorganismo de Nivel de Bio-Seguridad 1.

Los resultados del análisis para la cepa 05057219 utilizando API2ONE se investigaron en cuanto a la base de datos del National Institute for Agro-Environmental Sciences. Dado que el resultado de la investigación indicaba la posibilidad de que la cepa 05057219 fuese *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* aun con una probabilidad considerablemente baja de 9%, se realizó el test siguiente para comprobar esta posibilidad examinando si la cepa 05057219 es patógena o no para la col china y la lechuga, para las cuales se sabe que *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* son patógenas.

Una solución de cultivo obtenida sometiendo la cepa 05057219 a un cultivo líquido se centrifugó y se recuperó la célula bacteriana. La célula bacteriana recogida se suspendió en agua, y se añadió ulteriormente agua a la misma a fin de ajustar A<sub>600</sub> de la suspensión de células bacterianas a 1,0. Las secciones del nervio central de la col china se sumergieron en la suspensión de células bacterianas. Las secciones se retiraron de la suspensión de células bacterianas y se incubaron durante 4 días a 28°C. Se observaron luego las secciones de col china, pero no había traza alguna de síntoma (aparición de manchas sumergidas de color verde-pardo) de manchas bacterianas de la col china, que es una enfermedad cuya bacteria patógena es *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*.

Se realizó un test similar utilizando lechuga en lugar de col china pero, una vez más, no se apreciaba traza alguna de síntoma (aparición de lesión sumergida así como pardeo y expansión de la vena de la hoja) de las manchas bacterianas de la lechuga, que es una enfermedad cuya bacteria patógena es *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*. Adicionalmente, como se muestra en la Tabla 2 anterior, la cepa 05057219 no causaba pudrición del tubérculo en las patatas. Por estos hechos se confirmó que la cepa 05057219 no es *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*.

4. Preparación de la suspensión de células bacterianas

En un matraz cónico de 300 ml de capacidad se pusieron 150 ml de un caldo de método estándar (0,25% extracto de levadura, 0,5% peptona, 0,1% glucosa, pH 7,0) y se esterilizaron por calentamiento. Se inoculó en ello 0,1 ml del precultivo de la cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae* (FERM BP-10912) y se cultivó durante 3 días a 100 rpm a 30°C en una máquina de sacudidas alternativa. La solución de cultivo así obtenida se centrifugó para eliminar el sobrenadante. El precipitado se lavó con agua, para lo cual se realizó centrifugación una vez más, después de lo cual se separó el sobrenadante y se lavó el precipitado con agua. De este modo se obtuvo la suspensión de células bacterianas de la cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae*.

5. Preparación de una composición de polvo humectable controlador de enfermedades de las plantas

La suspensión de células bacterianas preparada en "4." arriba se liofilizó. El recuento de bacterias viables del material secado era  $1,0 \times 10^{11}$  cfu/g. se mezclaron uniformemente 10 partes en peso de la célula bacteriana secada, 9 partes en peso del condensado de naftalenosulfonato (de sodio)-formaldehído y 81 partes en peso de sulfato de calcio y un hidrato del mismo para obtener una composición de polvo humectable. La composición de polvo humectable es un agente farmacéutico que tiene la cepa *Pseudomonas rhodesiae* 05057219 como ingrediente activo.

[Ejemplo de Test 1]

Test para evaluación del efecto controlador contra la pudrición blanda bacteriana de la lechuga (test de interior)

La suspensión de células bacterianas obtenida en el punto "4." arriba mencionado se diluyó con agua para preparar una solución de tratamiento ( $A_{600} = 0,1$ ). La solución de tratamiento se pulverizó sobre el extremo cortado de una hoja cortada del nervio central de la lechuga. Como ejemplo comparativo, se pulverizó de manera similar una dilución de 1000 veces de polvo humectable Biokeeper (marca comercial) (CENTRAL GLASS Co. Ltd.). Cada lechuga que se sometió al tratamiento de pulverización se incubó durante 5 horas a 28°C en condiciones humidificadas. Una suspensión acuosa ( $A_{600} = 0,5$ ) de bacteria patógena de la pudrición blanda bacteriana de la lechuga (*Erwinia carotovora*) se inoculó en el extremo cortado de cada lechuga, seguido por incubación durante 4 días a 28°C. Subsiguientemente, se investigó el grado de aparición de la enfermedad de acuerdo con los estándares siguientes, y se calcularon la severidad de la enfermedad y el vapor preventivo basados en las fórmulas 1 y 2 siguientes.

Estándar 0: No se observa patología alguna

Estándar 1: Se observa patología en menos del 10% del nervio central

Estándar 2: Se observa patología en el 10 al 50% del nervio central

Estándar 3: Se observa patología en el 50 al 75% del nervio central

Estándar 4: La patología excede del 75% del nervio central

[Fórmula 1]

$$\text{Severidad de la enfermedad} = \frac{(1 \times n1 + 2 \times n2, + 3 \times n3 + 4 \times n4)}{4 \times (\text{Número total de hojas investigadas})} \times 100$$

n1 a n4 representan el número de hojas correspondientes respectivamente a los estándares 1 a 4.

[Fórmula 2]

$$\text{Valor preventivo} = (1 - (\text{Severidad de la enfermedad en el área afectada}) / (\text{Severidad de la enfermedad en el área sin tratar})) \times 100$$

Los resultados del test para evaluación del efecto controlador contra la pudrición blanda bacteriana de la lechuga (test de interior) se muestran en la Tabla 3.

[Tabla 3]

	Estudio de severidad de la enfermedad para la pudrición blanda bacteriana	
	Severidad de la enfermedad	Valor preventivo
Pseudomonas rhodesiae, cepa 05057219	20,0	72,4
Polvo humectable Biokeeper	25,0	65,5
Sin tratar	72,5	-

- 5 Como resulta evidente por la Tabla 3, se confirmó que la cepa 05057219 de Pseudomonas rhodesiae demuestra un valor preventivo de 72,4 y tiene un efecto controlador excelente contra la pudrición blanda bacteriana de la lechuga. Además, la cepa 05057219 de Pseudomonas rhodesiae exhibía un valor preventivo mayor que el del polvo humectable Biokeeper (marca comercial) que utiliza Erwinia carotovora no patógena.

[Ejemplo de Test 2]

Test para evaluación del efecto controlador contra la pudrición blanda bacteriana en la col china (test de campo)

- 10 La suspensión de células bacterianas obtenida en el método "4." arriba mencionado se diluyó con agua para preparar una solución de tratamiento ( $A_{600} = 0,1$ ). La solución de tratamiento se pulverizó sobre col china plantada fijamente en el campo. Como ejemplo comparativo, una dilución de 1000 veces de polvo humectable Biokeeper (marca comercial) (CENTRAL GLASS Co. Ltd.) o una dilución de 1000 veces de polvo humectable Coppersin (marca comercial) (Meiji Seika Kaisha, Ltd.) se pulverizó de manera similar. El tratamiento de pulverización se llevó a cabo dos veces con el intervalo de una semana. El día del primer tratamiento de pulverización, se inoculó una suspensión acuosa ( $A_{600} = 0,1$ ) de bacterias patógenas de la pudrición blanda bacteriana en la col china (Erwinia carotovora) por pulverización. Una semana después del segundo tratamiento de pulverización, se investigó el grado de aparición de la enfermedad de acuerdo con los estándares siguientes, y la severidad de la enfermedad, la tasa de aparición de la cepa y el valor preventivo se calcularon basados en las fórmulas 3, 4 y 5 siguientes.

- 20 Estándar 0: No se observa aparición de la enfermedad

Estándar 1: Se observa aparición de la enfermedad en parte de la hoja exterior

Estándar 2: Se observa aparición de la enfermedad en parte de la hoja exterior y la cabezuela

Estándar 3: Se observa aparición de la enfermedad en la mayor parte de la cabezuela

[Fórmula 3]

- 25 Severidad de la enfermedad: 
$$\frac{(1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3)}{3 \times (\text{Número total de cepas investigadas})} \times 100$$

n1 a n3 representan el número de cepas correspondientes respectivamente a los estándares 1 a 3.

- 30 [Fórmula 4]

Tasa de aparición de la cepa =  $(\text{Número de cepas enfermas} / \text{Número total de cepas investigadas}) \times 100$

[Fórmula 5]

- 35 Valor preventivo =  $1 - \frac{\text{Severidad de la enfermedad (o tasa de aparición de la cepa) en el área tratada}}{\text{Severidad de la enfermedad (o tasa de aparición de la cepa) en el área sin tratar}} \times 100$

Los resultados del test para evaluación del efecto controlador contra la pudrición blanda bacteriana en la col china (ensayo de campo) se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 4]

	Estudio de severidad de la enfermedad para la pudrición blanda bacteriana			
	Severidad preventiva	Valor preventivo	Tasa de aparición de la cepa	Nivel de control
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> , cepa 050572I9	3,7	72,2	11,1	72,3
Polvo humectable Biokeeper	10,0	25,0	30,0	25,0
Polvo humectable Coppersin	3,3	75,0	10,0	75,0
Sin tratar	13,3	-	40,0	-

5 Como es evidente por la Tabla 4, la cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* tiene un valor preventivo de 72,2 con relación a la severidad de la enfermedad y un valor preventivo de 72,3 con relación a la tasa de aparición de la cepa. De acuerdo con ello, se confirmó que la cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* tiene un efecto controlador excelente contra la pudrición blanda bacteriana en la col china. Además, el valor preventivo de la cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* era igual al del polvo humectable Coppersin (marca comercial), un agente controlador químico que tiene cloruro de cobre básico como componente principal, y era mucho mayor que el del polvo humectable Biokeeper (marca comercial) que utiliza *Erwinia carotovora* no patógena.

10 [Ejemplo de Test 3]

Test para evaluación del efecto controlador contra el cancro de los cítricos (ensayo de interior)

15 La suspensión de células bacterianas obtenidas en el punto "4." arriba mencionado se diluyó con agua para preparar una solución de tratamiento ( $A_{600} = 0,1$ ). La solución de tratamiento se pulverizó sobre hojas de cítricos (limón) que se habían raspado con un cuchillo quirúrgico. Como ejemplo comparativo, se pulverizó de manera similar una dilución de 1000 veces de polvo humectable Agrept (marca comercial) (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), y las hojas se incubaron durante 5 horas a 28°C en condición humidificada. Se inoculó una suspensión acuosa ( $A_{600} = 0,5$ ) de bacteria patógena del cancro de los cítricos (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) en el sitio cortado, seguido por incubación durante 7 días a 28°C. Subsiguientemente, se investigó el grado de aparición de la enfermedad de acuerdo con los estándares siguientes, y se calcularon la severidad de la enfermedad y el valor preventivo basados en las fórmulas 6 y 7 siguientes.

20

Estándar 0: No se observa lesión alguna

Estándar 1: Se observa apenas la lesión

Estándar 2: Se observa la lesión

Estándar 3: Se observa acusadamente la lesión

25 [Fórmula 6]

$$\text{Severidad de la enfermedad} = \frac{(1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3)}{3 \times (\text{Número total investigado})} \times 100$$

$n_1$  a  $n_3$  representan el número de lesiones correspondientes respectivamente a los estándares 1 a 3.

30 [Fórmula 7]

$$\text{Valor preventivo} = (1 - (\text{Severidad de la enfermedad en el área tratada} / \text{Severidad de la enfermedad en el área sin tratar})) \times 100$$

Los resultados del test para evaluación del efecto controlador contra el cancro de los cítricos (ensayo de interiores) se muestran en la Tabla 5.

35 [Tabla 5]

	Estudio de severidad de la enfermedad para el cancro de los cítricos	
	Severidad de la enfermedad	Valor preventivo
Pseudomonas rhodesiae,	16,7	81,8
Polvo humectable Agrept	54,2	40,9
Sin tratar	91,7	-

5 Como resulta evidente por la Tabla 5, se confirmó que la cepa 05057219 de Pseudomonas rhodesiae demuestra un valor preventivo de 81,8 y tiene un efecto controlador excelente contra el cancro de los cítricos. Además, la cepa 05057219 de Pseudomonas rhodesiae exhibía un valor preventivo notablemente mayor que el del polvo humectable Agrept (marca comercial), que es un agente controlador químico que comprende sulfato de estreptomycin como componente principal.

[Ejemplo de Test 4]

Test para evaluación del efecto controlador contra el cancro de los cítricos (ensayo de campo)

10 La suspensión de células bacterianas obtenida en el punto “4.” arriba mencionado se diluyó con agua para preparar una solución de tratamiento ( $A_{600} = 0,05$ ). La solución de tratamiento se pulverizó por todas partes sobre un árbol de naranjas nável. Como ejemplo comparativo, se pulverizó de manera similar una dilución de 1000 veces de polvo humectable Coppersin (marca comercial) (Meiji Seika Kaisha, Ltd.). El tratamiento de pulverización se realizó de nuevo 10 días después del desprendimiento de las flores, y una sola vez 2 a 3 semanas después, es decir, 3  
15 tratamientos de pulverización en total. Siete días después del tratamiento de pulverización final, se investigó el grado de aparición de la enfermedad de las hojas y los frutos del naranjo de acuerdo con los estándares siguientes, y se calcularon la severidad de la enfermedad, la tasa de aparición en las hojas, la tasa de aparición en los frutos jóvenes y el valor preventivo basados en las fórmulas 8, 9, 10 y 11 siguientes.

Estándar 0: No se observa lesión alguna

Estándar 1: El número de lesiones es 1 a 3

20 Estándar 2: El número de lesiones es 4 a 10

Estándar 3: El número de lesiones es 11 a 20

Estándar 4: El número de lesiones es 21 o más

[Fórmula 8]

25 Severidad de la enfermedad: 
$$\frac{(1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4)}{4 \times (\text{Número total de hojas y frutos jóvenes investigados})} \times 100$$

$n_1$  a  $n_4$  representan el número de hojas y frutos jóvenes correspondientes respectivamente a los estándares 1 a 4.

[Fórmula 9]

Tasa de aparición en las hojas:  $(\text{Número de hojas enfermas} / \text{Número total de hojas investigadas}) \times 100$

30 [Fórmula 10]

Tasa de aparición en los frutos jóvenes:  $(\text{Número de frutos jóvenes enfermos} / \text{Número total de frutos jóvenes investigados}) \times 100$

[Fórmula 11]

35 Valor preventivo 1- 
$$\frac{\text{Severidad de la enfermedad (o tasa de aparición de la cepa) en el área tratada}}{\text{Grado de la enfermedad (o tasa de aparición de la cepa) en el área sin tratar}} \times 100$$

Los valores preventivos con relación a la tasa de aparición en las hojas y la tasa de aparición en los frutos jóvenes se calcularon de manera similar.

Los resultados del test para evaluación del efecto controlador contra el cancro de los cítricos (ensayo de campo) se muestran en la Tabla 6 (hoja de cítrico) y la Tabla 7 (fruto joven de cítrico).

[Tabla 6]

	Hoja de cítrico			
	Severidad de la enfermedad	Valor preventivo	Tasa de aparición en las hojas	Valor preventivo
Pseudomonas rhodesiae, cepa 05057219	4,1	72,5	12,5	67,5
Sin tratar	15,0	-	38,6	-

5

[Tabla 7]

	Fruto cítrico joven			
	Severidad de la enfermedad	Valor preventivo	Fruto joven	Valor preventivo
Pseudomonas rhodesiae, cepa 05057219	13,3	77,5	32,1	60,7
Sin tratar	59,2	-	81,8	-

10 Como resulta evidente por las Tablas 6 y 7, se confirmó que la cepa 05057219 de Pseudomonas rhodesiae demuestra un alto valor preventivo, en donde el valor preventivo con relación a la severidad de la enfermedad en las hojas era 72,5, y el valor preventivo con relación a la tasa de aparición en las hojas era 67,5. Adicionalmente, se confirmó que la cepa 05057219 de Pseudomonas rhodesiae demuestra un alto valor preventivo, en donde el valor preventivo con relación a la severidad de la enfermedad en los frutos jóvenes era 77,5, y el valor preventivo con relación a la tasa de aparición en los frutos jóvenes era 60,7.

15 [Ejemplo de Test 5]

Test para evaluación del efecto controlador contra la pudrición blanda bacteriana en la lechuga (ensayo de interior).

20 La suspensión de células bacterianas obtenida en el punto "4." arriba mencionado se diluyó con agua para preparar una solución de tratamiento ( $A_{600} = 0,05$ ). Adicionalmente, se preparó una suspensión de células bacterianas cultivando la cepa JCM1940 de Pseudomonas rhodesiae de manera similar al punto "4." arriba mencionado. A partir de esta suspensión de células bacterianas, se formuló un polvo humectable y se preparó de manera similar al punto "5." arriba mencionado. Este polvo humectable se diluyó con agua para preparar una solución de tratamiento ( $A_{600} = 0,05$ ). Ulteriormente, se preparó una suspensión de células bacterianas por cultivo de la cepa NBRC14160 de Pseudomonas fluorescens de manera similar al punto "4." arriba mencionado, suspensión de células bacterianas que se diluyó con agua para preparar una solución de tratamiento ( $A_{600} = 0,05$ ).

25 La solución de tratamiento en la cual la suspensión de células bacterianas obtenida en "4." se había diluido se pulverizó sobre el extremo cortado de una hoja cortada del nervio central de la lechuga. Ulteriormente, la solución de tratamiento en la cual se había diluido una suspensión de células bacterianas que contenía la cepa JCM11940 de Pseudomonas rhodesiae se pulverizó de manera similar sobre el extremo cortado de una hoja cortada del nervio central de la lechuga. Además, como ejemplo comparativo, la solución de tratamiento en la cual se había diluido una  
30 suspensión de células bacterianas que contenía la cepa NBRC14160 de Pseudomonas fluorescens se pulverizó de manera similar sobre el extremo cortado de una hoja cortada del nervio central de la lechuga.

Cada una de las lechugas tratadas con la pulverización se incubó durante 5 horas a 25°C en condición humidificada. Se inoculó luego una suspensión acuosa ( $A_{600} = 0,5$ ) de bacterias patógenas de la pudrición blanda bacteriana de la

## ES 2 430 558 T3

lechuga (*Erwinia carotovora*) en el sitio cortado, seguido por incubación durante 5 días a 25°C. Subsiguientemente, se investigó el grado de aparición de la enfermedad de acuerdo con los estándares siguientes, y se calcularon la severidad de la enfermedad y el valor preventivo basados en las fórmulas 12 y 13 siguientes.

Estándar 0: No se observa patología alguna

- 5 Estándar 1: Se observa patología en menos de 10% del nervio central
- Estándar 2: Se observa patología en 10 - 50% del nervio central
- Estándar 3: Se observa patología en 50-75% del nervio central
- Estándar 4: La patología excede de 75% del nervio central

[Fórmula 12]

10 Severidad de la enfermedad = 
$$\frac{(1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3 + 4 \times n4)}{4 \times (\text{Número total de hojas investigadas})} \times 100$$

n1 a n4 representan el número de hojas correspondientes respectivamente a los estándares 1 a 4.

15 [Fórmula 13]

Valor preventivo =  $(1 - (\text{Severidad de la enfermedad en el área tratada} / \text{Severidad de la enfermedad en el área sin tratar})) \times 100$

Los resultados del test para evaluación del efecto controlador contra la pudrición blanda bacteriana de la lechuga (test de interior) se muestran en la Tabla 8.

20 [Tabla 8]

	Estudio de severidad de la enfermedad para la pudrición blanda bacteriana	
	Severidad de la enfermedad	Valor preventivo
Pseudomonas rhodesiae, cepa 05057219	15,0	82,9
Pseudomonas rhodesiae, cepa JCM11940	37,5	57,1
Pseudomonas fluorescens, cepa NBRC14160	95,0	0,0
Sin tratar	87,5	-

25 Como resulta evidente por la Tabla 8, se confirmó que la cepa JCM11940 de *Pseudomonas rhodesiae* demuestra un valor preventivo de 57,1 y tiene un efecto controlador contra la pudrición blanda bacteriana de la lechuga, aunque el efecto es inferior al de la cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae*. Por el contrario, *Pseudomonas fluorescens*, que es una especie afín de *Pseudomonas rhodesiae*, demostró un valor preventivo de 0,0 y se confirmó que no posee efecto controlador alguno contra la pudrición blanda bacteriana de la lechuga.

[Ejemplo de Test 6]

Test para evaluación del efecto controlador contra las manchas bacterianas de la lechuga (test de interior)

30 La suspensión de células bacterianas obtenida en el punto "4." arriba mencionado se diluyó con agua para preparar una solución de tratamiento ( $A_{600} = 0,05$ ). En esta solución de tratamiento, se sumergió durante 10 minutos una hoja cortada que estaba centrada en el nervio central de la lechuga. Como ejemplo comparativo, se realizó un tratamiento de inmersión similar utilizando una dilución de 1000 veces del polvo humectable Vegikeeper (marca comercial)

(CENTRAL GLASS Co., Ltd.). Cada hoja de lechuga tratada químicamente se incubó durante 5 horas a 25°C en condición humidificada. Se inoculó una suspensión acuosa ( $A_{600} = 0,01$ ) de la bacteria patógena de las manchas bacterianas de la lechuga (*Pseudomonas cichorii* PCL2001) en ambos lados de la sección transversal de la sección de la hoja con 20 µl en cada lado, seguido por incubación durante 5 días a 25°C. Subsiguientemente, se investigó la severidad de la enfermedad de acuerdo con los estándares siguientes.

Estándar 0: No se observa patología alguna

Estándar 1: Se observan síntomas en menos de 10% del nervio central

Estándar 2: Se observan síntomas en 10 - 50% del nervio central

Estándar 3: Se observan síntomas en 50 - 75% del nervio central

Estándar 4: Los síntomas exceden de 75% del nervio central

[Fórmula 14]

$$\text{Severidad de la enfermedad} = \frac{(1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3 + 4 \times n4)}{4 \times (\text{Número total de hojas investigadas})} \times 100$$

n1 a n4 representan el número de hojas correspondientes respectivamente a los estándares 1 a 4.

[Fórmula 15]

$$\text{Valor preventivo} = (1 - (\text{Severidad de la enfermedad en el área tratada} / \text{Severidad de la enfermedad en el área sin tratar})) \times 100$$

[Tabla 9]

	Estudio de severidad de la enfermedad para las manchas bacterianas	
	Severidad de la enfermedad	Valor preventivo
Pseudomonas rhodesiae, cepa 05057219	2,5	87,5
Polvo humectable Vegikeeper	5,0	75,0
Sin tratar	20,0	-

Como resulta evidente por la Tabla 9, se reconoció que la cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae* demuestra un valor preventivo de 87,5 y tiene un efecto controlador fuerte contra las manchas bacterianas de la lechuga. Adicionalmente, la cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae* demostraba un valor preventivo mayor que el del polvo humectable Vegikeeper (marca comercial).

[Ejemplo de Test 7]

Test para evaluación del efecto controlador contra la pudrición negra en la col (test de interior)

La suspensión de células bacterianas obtenida en el punto "4." arriba mencionado se diluyó con agua para preparar una solución de tratamiento ( $A_{600} = 0,05$ ). En esta solución de tratamiento, se sumergió durante 10 min una sección de hoja cortada de la hoja de col que estaba centrada en la vena de la hoja. Como ejemplo comparativo, se realizó un tratamiento de inmersión similar utilizando una dilución de 1000 veces del polvo humectable Vegikeeper (marca comercial) (CENTRAL GLASS Co., Ltd.). Cada hoja de col tratada químicamente se incubó durante 5 horas a 25°C en condiciones humidificadas. Una suspensión acuosa ( $A_{600} = 1,0$ ) de la bacteria patógena de la pudrición negra de la col (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* CAX303) se inoculó por ambos lados de la sección transversal de la sección de hoja con 20 µl en cada lado, seguido por incubación durante 8 días a 25°C. Subsiguientemente, se investigó el grado de severidad de la enfermedad de acuerdo con los estándares siguientes.

Estándar 0: No se observa patología alguna

## ES 2 430 558 T3

Estándar 1: Los síntomas se aprecian sólo en una parte de la hoja cortada

Estándar 2: Los síntomas aparecen hasta en una parte de la vena de la hoja

Estándar 3: Los síntomas aparecen en toda la vena de la hoja

Estándar 4: Los síntomas aparecen en toda la vena de la hoja y hasta en la superficie de la hoja

5 [Fórmula 16]

$$\text{Severidad de la enfermedad} = \frac{(1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3 + 4 \times n4)}{4 \times (\text{Número total de hojas investigadas})} \times 100$$

10 n1 a n4 representan el número de hojas correspondientes respectivamente a los estándares 1 a 4.

[Fórmula 17]

Valor preventivo =  $(1 - (\text{Severidad de la enfermedad en el área tratada} / \text{Severidad de la enfermedad en el área sin tratar})) \times 100$

[Tabla 10]

Polvo humectable en ensayo	Estudio de severidad de la enfermedad para la pudrición negra la enfermedad para la pudrición negra	
	Severidad de la enfermedad	Valor preventivo
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> , cepa 05057219	25,0	60,0
Polvo humectable Vegikeeper	45,0	28,0
Sin tratar	62,5	-

15

Como resulta evidente por la Tabla 10, la cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae* demostraba un valor preventivo de 60,0 y tenía un fuerte efecto controlador contra la pudrición negra en la col. Adicionalmente, la cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae* demostraba un valor preventivo mayor que el del polvo humectable Vegikeeper (marca comercial).

20 [Ejemplo de Test 8]

Test para evaluación del efecto controlador contra el “shot hole” bacteriano del melocotón (ensayo de campo)

La suspensión de células bacterianas obtenida en el punto “4.” arriba mencionado se diluyó con agua para preparar una solución de tratamiento ( $A_{600} = 0,1$ ). La solución de tratamiento se pulverizó sobre la totalidad de un melocotonero. El primer tratamiento de pulverización se realizó inmediatamente después del desprendimiento de las flores, y los tratamientos de pulverización se condujeron subsiguientemente al cabo de 7 días, 22 días, 34 días y 49 días después del primer tratamiento, lo cual da como resultado 5 tratamientos de pulverización en total. 15 días después del segundo tratamiento de pulverización, 6 días después del cuarto tratamiento de pulverización, y 8 días después del último tratamiento de pulverización, se investigaron nuevos brotes alrededor de GL-1 del árbol respecto a los números de hojas sanas y hojas enfermas, y se calculó el valor preventivo.

30 [Tabla 11]

	Primer estudio		Segundo estudio		Tercer estudio	
	Tasa de aparición de hojas (%)	Valor preventivo	Tasa de aparición de hojas (%)	Valor preventivo	Tasa de aparición de hojas (%)	Valor preventivo
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> ,	13,3	64,9	27,4	55,3	15,3	50,4

	Primer estudio		Segundo estudio		Tercer estudio	
	Tasa de aparición de hojas (%)	Valor preventivo	Tasa de aparición de hojas (%)	Valor preventivo	Tasa de aparición de hojas (%)	Valor preventivo
cepa 05057219						
Sin tratar	38,0	-	61,2	-	30,8	-

Como resulta evidente por la Tabla 11, la cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae* demostraba un valor preventivo de aproximadamente 50-65 y tenía un efecto controlador fuerte para los melocotones en la estación de crecimiento contra el "shot hole" bacteriano del melocotón.

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Nippon Soda Co., Ltd.	
	<120> Microorganismo capaz de controlar enfermedades de las plantas y agente controlador de enfermedades de las plantas que utiliza el microorganismo.	
	<130> Caso 775	
10	<150> JP 2006-302263	
	<151> 8-11-2006	
	<160> 3	
15	<170> PatentIn versión 3.4	
	<210> 1	
	<211> 1422	
20	<212> DNA	
	<213> Pseudomonas rhodesiae	
	<400> 1	
	<b>ggcctaacac atgcaagtcg agcggtagag agaagcttgc ttctcttgag agcggcggac</b>	<b>60</b>
	<b>gggtgagtaa tgctaggaa tctgcttggg agtgggggat aacgttcgga aacggacgct</b>	<b>120</b>
	<b>aataccgcat acgtctacg ggagaaagca ggggacctc ggccttgcg ctatcagatg</b>	<b>180</b>
	<b>agcctaggtc ggattagcta gttggtgggg taatggctca ccaaggcgac gatccgtaac</b>	<b>240</b>
	<b>tggtctgaga ggatgatcag tcacactgga actgagacac ggtccagact cctacgggag</b>	<b>300</b>
	<b>gcagcagtgg ggaatattgg acaatggcg aaagcctgat ccagccatgc cgcgtgtgtg</b>	<b>360</b>
	<b>aagaaggtct tcggattgta aagcacttta agttgggagg aaggccatt acctaatacg</b>	<b>420</b>

ES 2 430 558 T3

tgatggttt gacgttaccg acagaataag caccggctaa ctctgtgcca gcagccgagg 480  
 taatacagag ggtgcaagcg ttaatcggaa ttactggggcg taaagcgcgc gtaggtggtt 540  
 tgtaagtgg gatgtgaaat ccccgggctc aacctgggaa ctgcattcaa aactgactga 600  
 cttagatag gtagaggggtg gtggaatttc ctgtgtagcg gtgaaatgcg tagatatagg 660  
 aaggaacacc agtggcgaag gcgaccacct ggactgatac tgacactgag gtgcga aagc 720  
 gtggggagca aacaggatta gataacctgg tagtccacgc cgtaaacgat gtcaactagc 780  
 cgttggggagc cttgagctct tagtggcgca gctaacgcat taagttgacc gcctggggag 840  
 tacggccgca aggttaaaac tcaaatgaat tgacgggggc cgcacaagc ggtggagcat 900  
 gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggcc ttgacatcca atgaacttc 960  
 tagagataga ttggtgcctt cgggaacatt gagacagggtg ctgcatggct gtcgtcagct 1020  
 cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgct aacgagcgc acccttgtcc ttagttacca 1080  
 gcacgttatg gtgggcactc taaggagact gccggtgaca aaccggagga aggtggggat 1140  
 gacgtcaagt catcatggcc cttacggcct gggtacaca cgtgctaaa tggtcggtac 1200  
 aaagggttgc caagccgca ggtggagcta atcccataaa accgatcgta gtccggatcg 1260  
 cagtctgcaa ctgactgcg tgaagtcgga atcgtagta atcgcgaatc agaatgtcg 1320  
 ggtgaatacg ttcccggcc ttgtacacac cgcccgtcac accatgggag tgggttcac 1380  
 cagaagtgc tagtctaacc ttcgggggga cggttaccac gg 1422

<210> 2  
 <211> 20  
 5 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador 16S 27F

# ES 2 430 558 T3

<400> 2  
agagttgat cctggctcag 20

5 <210> 3  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> cebador 16S 1544R

<400> 3  
agaaaggagg tgatccagcc 20

15

20

**REIVINDICACIONES**

1. *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 que tiene una capacidad de control contra una enfermedad de las plantas.
- 5 2. Una variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912, en donde la variante tiene las mismas propiedades micológicas y capacidad de control contra una enfermedad de las plantas que las de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912.
- 10 3. *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912, o una variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la enfermedad de las plantas es una o más enfermedades seleccionadas de cancro, "shot hole" bacteriano, pudrición blanda bacteriana, manchas bacterianas, manchas bacterianas negras, marchitamiento bacteriano, manchas necróticas de las hojas, necrosis del endocarpio, pudrición bacteriana de los granos, tizón bacteriano de las plantas jóvenes, tizón bacteriano de las hojas, manchas bacterianas, y pudrición negra.
- 15 4. *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912, o una variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la enfermedad de las plantas es una enfermedad en una planta causada por una o más bacterias patógenas seleccionadas del género *Xanthomonas*, el género *Erwinia*, el género *Pseudomonas*, el género *Ralstonia* , y el género *Burkholderia*.
- 20 5. Un agente controlador de enfermedades de las plantas que contiene una célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912, o una variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 que tiene las mismas propiedades micológicas y capacidad de control contra una enfermedad de las plantas que las de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912.
- 25 6. El agente controlador de enfermedades de las plantas de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la enfermedad de las plantas es una o más enfermedades de las plantas seleccionadas de cancro, "shot hole" bacteriano, pudrición blanda bacteriana, manchas bacterianas, manchas bacterianas negras, marchitamiento bacteriano, manchas necróticas de las hojas, necrosis del endocarpio, pudrición bacteriana de los granos, tizón bacteriano de las plantas jóvenes, tizón bacteriano de las hojas, manchas bacterianas, y pudrición negra.
7. Un método para controlar una enfermedad de las plantas, en donde *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912, o una variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 se aplica a una planta y/o al suelo de cultivo de la planta.

[Fig. 1]

