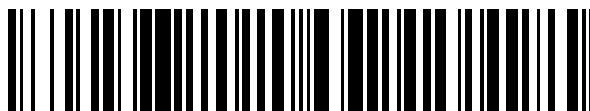


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 518 923**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

A01N 25/00 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2008 E 08736711 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2138044**

54 Título: **Un cultivo puro de la cepa AH2 de la especie Bacillus Velezensis y producto para el control biológico de hongos fitopatógenos**

30 Prioridad:

19.03.2007 ES 200700711

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

05.11.2014

73 Titular/es:

**PROBELTE, SA (100.0%)
CTRA. DE MADRID KM. 389 POL. INDUSTRIAL EL TIRO
30100 ESPINARDO, MURCIA, ES**

72 Inventor/es:

**FERNANDEZ MARTINEZ, ANA ISABEL;
VILLAVERDE FERNANDEZ, MARIO JORGE;
CASANOVA ROCA, JUAN ANTONIO;
MALO LOPEZ-ROMAN, JORGE;
NICOLAS MARTINEZ, JOSÉ ANTONIO y
BLANCA PICÓ, ISIDRO**

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 518 923 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

Un cultivo puro de la cepa AH2 de la especie *Bacillus velezensis* y producto para el control biológico de hongos fitopatógenos.

5 Objeto de la invención

10 El objeto de la presente invención es un producto para el control biológico de hongos fitopatógenos, constituido por células viables de un nuevo aislado de *Bacillus velezensis* (Ruiz-García y col., 2005) cepa AH2, que presenta una elevada actividad antifúngica, particularmente frente a diferentes hongos fitopatógenos, así como una buena capacidad para estimular el crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos. El producto ha sido formulado a partir de un caldo fermentado, obtenido mediante un cultivo sumergido agitado, el cual es utilizado directamente en la formulación. Este formulado mantiene una elevada actividad por al menos seis meses a temperatura ambiente. Constituye además motivo de la presente invención la cepa de *Bacillus velezensis* AH2 empleada en la obtención del formulado.

15 Estado de la técnica

20 Desde hace años, ha sido reconocida la necesidad e importancia de desarrollar y ampliar los procedimientos de Producción Integrada y de Agricultura Ecológica, como alternativa al uso indiscriminado de productos químicos en la agricultura, para reducir los efectos nocivos de estos últimos. El uso de biopreparados a partir de microorganismos para el control biológico de plagas y enfermedades, así como para la fertilización de cultivos de interés comercial, se presenta como una de las alternativas más prometedoras dentro de este contexto. Además, estos biopreparados desempeñan un importante papel en los modelos de agricultura sostenible debido a la posibilidad de producirse a partir de recursos renovables (Altieri, 1997).

30 La ventaja fundamental que tiene esta vía es que por basarse en mecanismos naturales, se trata de una alternativa ecológica, respetuosa con el medio ambiente, no contaminante, y que reduce notablemente los riesgos de adquisición de resistencia por parte de los patógenos. También, al ser selectivos en su modo de acción, en general es poco probable que dañen a otros organismos beneficiosos y en muchos casos benefician al ecosistema y estimulan el crecimiento vegetal, haciendo más sostenible la producción agrícola, a la vez que los efectos sobre la salud humana son mínimos o nulos. Prácticamente todas las plagas y enfermedades son afectadas en alguna medida por organismos antagonistas. En muchos casos estos entes biológicos representan el factor más importante en la regulación de las poblaciones de organismos patógenos en la naturaleza.

35 Uno de los grupos más importantes entre los organismos causantes de enfermedades de las plantas son los hongos fitopatógenos, que incluye especies de los géneros *Botrytis*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Thielaviopsis* y *Botryosphaeria* entre muchos otros, los cuales pueden sobrevivir durante muchos años en el suelo.

40 En la búsqueda de agentes para el control biológico que puedan llegar a tener un interés comercial, hay que tener en cuenta una serie de factores que estudiados en su conjunto pueden conducir a un resultado exitoso. Entre estos se podría mencionar, los entes biológicos a utilizar ya sea independientemente o en inóculos mixtos, la actividad biológica específica, los mecanismos de acción frente al patógeno, el sistema de producción empleado, así como el tipo de formulación y su estabilidad (Warrior, 2000).

45 Diversos mecanismos han sido descritos para explicar el fenómeno de control biológico de estos patógenos, tales como parasitismo, protección cruzada, antibiosis, competición e inducción de resistencia, entre otros (Shoda, 2000, Walsh y col., 2001).

50 Uno de los nichos ecológicos más estudiados ha sido la rizosfera, por las relaciones que aquí se establecen entre plantas y otros organismos (Warrior, 2000). Desde la década de los 80 se ha venido estudiando los microorganismos de la rizosfera, como posibles sustitutos de los plaguicidas químicos para controlar una amplia gama de enfermedades. Debido a su abundante distribución en suelo, su capacidad de colonizar las raíces de las plantas, y de producir una gran variedad de compuestos beneficiosos, así como antagonistas de un elevado número de patógenos, estos organismos resultan muy adecuados para el control biológico de plagas y enfermedades. (Anjaiah y col., 1998; Hill y col., 1994; Maurhofer y col., 1991; Rodríguez, y Pfender. 1997; Ross y col., 2000 y Thomashow y col., 1997).

60 Entre los grupos microbianos de la rizosfera, que han sido ampliamente estudiados como agentes de control biológico de plagas y enfermedades producidas por los microorganismos, se encuentra el constituido por los hongos. El mismo ha sido empleado con éxito en el control de hongos patógenos pertenecientes a los géneros *Botrytis*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Penicillium*, y *Macrophomina* y otros (Whipps y Lumsden, 2001, McQuilken y col., 2001, Jones y Whipps, 2002, entre otros). Dado su metabolismo tan diverso, este grupo microbiano es capaz de producir una gran variedad de sustancias útiles para el control biológico. Por estas razones,

el número de cepas y productos a base de hongos para este fin es cada vez más amplio y variado (Cook y col., 1996, Whipps, 1997, Fravel y col., 1998, EPA USA 2006. US Pat 6,306,386 y US Pat 6,890,530 entre otros). Los mecanismos mediante los cuales se ejerce el control biológico de las enfermedades son complejos y se sabe que puede ser el resultado de la adición o sinergia entre varios de ellos. Entre estos se encuentra la competición por los nutrientes y el espacio, la capacidad de producir sustancias que impiden la germinación de la espora (fungistasis) o de producir muerte celular (antibiosis) y la modificación de la rizosfera acidificando el suelo, lo que impide la proliferación del patógeno. El biocontrol también puede resultar de una interacción directa entre el patógeno y el agente de biocontrol (parasitismo), mediante enzimas hidrolíticas tales como quitinasas y glucanasas, o la acción conjunta de éstas y los metabolitos tóxicos (Benitez, y col., 2004).

El empleo de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) para el control biológico de plagas y enfermedades ha sido también ampliamente estudiado. La particularidad fundamental de este tipo de agentes es que además de su efecto protector, poseen una amplia capacidad de colonizar las raíces de las plantas y un gran poder estimulador del crecimiento vegetal, lo que une al efecto protector una mejora general de la sanidad de los cultivos y de esta forma, la planta es también más resistente al ataque de los patógenos. Este grupo de agentes ha sido empleado en enfermedades producidas por hongos fitopatógenos pertenecientes a los géneros *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Thielaviopsis*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Botrytis* entre otros (Emmert y Handelsman, 1999, Ligon, y col., 2000, Cavaglieri, y col., 2004 y Roberts, y col., 2005, US Pat 7,118,739, entre otros).

El género *Pseudomonas* ha sido objeto de numerosos estudios a lo largo de años por ser uno de los agentes más activos y dominantes en la rizosfera (Geels y Schippers, 1983, de Freitas y Germida 1991, de la Cruz y col., 1992, Ligon, y col., 2000, US Pat 7,087,424). Miembros del género producen diferentes antibióticos que están íntimamente relacionados con la reducción y supresión de enfermedades de plantas. Otro factor que juega un papel fundamental en este fenómeno es la producción de sideróforos, lo cual contribuye además, al crecimiento de las plantas por la vía del suministro de hierro. Esta habilidad está muy extendida en miembros del género *Pseudomonas*. Sin embargo, la incapacidad del género para producir estructuras de resistencia durante su crecimiento, limita en alguna medida la estabilidad y efectividad de los biopreparados obtenidos con cepas de este género.

El género *Bacillus* también ha sido ampliamente estudiado, por presentar grandes potencialidades en este sentido. Éste tiene como características principales el hecho de estar prácticamente omnipresente en todo tipo de suelos, a lo cual une una elevada tolerancia térmica, un rápido crecimiento en medios líquidos y la formación de esporas de resistencia que le permite sobrevivir durante largos periodos de tiempo. Todo esto le confiere a las cepas del género un gran potencial como agentes de biocontrol. La Agencia Norteamericana de Protección del Medioambiente (EPA) tiene registradas más de diez cepas de diferentes especies de este género como bioplaguicidas y en particular biofungicidas (EPA 2006). Los principales mecanismos asociados al biocontrol de hongos fitopatógenos mediante cepas de este género, también incluyen la producción de antibióticos, sideróforos, surfactantes y enzimas hidrolíticas tales como quitinasas entre otros (Utkhede, 1984, Acea y col., 1988, Stanghellini y Miller 1996, Shoda 2000, Banat y col., 2000, Zhang, y col., 2001, Ruiz-García y col., 2005, US Pat 7,087,424 y EP1647188).

Otros géneros bacterianos han sido también estudiados como agentes para el biocontrol, entre los que se encuentran los géneros, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Stenotrophomonas* y *Streptomyces* (McClure, y col., 1998, Brewster y col., 1997, Sabaratnam and Traquair, 2002, Cavaglieri y col., 2004 y otros).

La forma física de un producto biopreparado es también un factor de gran importancia y que es necesario tener en cuenta. Lo que se busca, es que los microorganismos permanezcan viables en estado inactivo o metabólicamente activos (Fernández, 1995). Este último es uno de los problemas más importantes de la Biotecnología Agrícola, pues se trata no solamente de que las células microbianas se mantengan viables durante largos periodos de tiempo, sino que sean capaces de sobrevivir en el ambiente y realizar la función para la que fueron destinados.

El documento WO2005/059112 da a conocer un nuevo microorganismo *Bacillus amyloliquefaciens* KTGB0202 que es activo contra el *oidio*, *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Botrytis cinérea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Magnaporthe grisea*, *Puccinia recondita*, *Corticium sasaki* y *Candida* sp., e inhibe la infección del virus del mosaico del tabaco. El documento WO2005/059112 también dio a conocer una sustancia activa antifúngica obtenida por extracción y purificación de la cepa KTGB0202.

La patente US6808917 da a conocer un inóculo que comprende una combinación de un hongo y una bacteria, en particular el hongo es *Trichoderma virens* y la bacteria es *Bacillus amyloliquefaciens*. Las cepas de la bacteria preferidas son *Bacillus amyloliquefaciens* TJ1000 o 1B. La combinación fúngica/bacteriana se utiliza como antagonista y su combinación suprime el crecimiento de hongos patógenos de las plantas. La combinación de *Trichoderma virens* y *Bacillus amyloliquefaciens* (fúngica/bacteriana) se utiliza como agente de biocontrol, biopesticida o biofungicida.

Cuando se trata de microorganismos esporógenos, generalmente existe una flexibilidad mayor en cuanto a la formulación, pues estos organismos pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo, siendo capaces de

germinar y multiplicarse una vez restablecidas las condiciones favorables. Las técnicas de inmovilización celular ofrecen toda una serie de ventajas con respecto a las células libres que las hacen muy atractivas para su aplicación práctica (Fernández, 1995, Vassileva y col., 1998a y 1998b, entre otros) y muy particularmente para la biotecnología ambiental. El empleo de células inmovilizadas puede potenciar los efectos de los microorganismos sin crear problemas de contaminación, dando lugar a productos muy activos y novedosos (Bellota y col., 1994, Núñez, 1998, Fonseca, 1998, Pat Esp. ES2234417).

Descripción de la invención

El objeto de la presente invención, es un producto para el control biológico de hongos fitopatógenos, constituido por células viables de un nuevo aislado de *Bacillus velezensis* (Ruiz-García y col., 2005) cepa AH2. Dicha cepa fue aislada de suelos de la Región de Murcia. La característica fundamental de este aislado, es que presenta una elevada actividad antifúngica frente a diferentes agentes causantes de enfermedades de cultivos de interés económico, tales como hongos de los géneros *Botrytis*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Thielaviopsis* y *Botryosphaeria*, entre otros. Por otra parte, posee la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas por diferentes mecanismos. Dicho microorganismo ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) que le ha asignado los números de depósito CECT-7221. La cepa fue identificada por los autores y se solicitó además la identificación en la CECT. La identificación de especie en la CECT se llevó a cabo mediante amplificación directa por PCR del gen del 16S rRNA, secuenciación parcial del mismo (con lecturas en las dos direcciones) y análisis de las secuencias, concluyéndose finalmente que se trata de *Bacillus velezensis*. El producto, para el control biológico de hongos fitopatógenos y la estimulación del crecimiento vegetal, consiste en una formulación líquida que contiene como materia activa principal, esporas viables del cultivo.

El microorganismo *Bacillus velezensis* cepa AH2 CECT-7221, así como sus mutantes constituyen igualmente objeto de esta invención. El mismo fue obtenido mediante un procedimiento que combina el aislamiento en medio Agar Nutritivo (Oxoid), previa eliminación de células vegetativas, y la selección a través de su facultad antagonista frente a diferentes hongos fitopatógenos, teniendo en cuenta además la capacidad para estimular el crecimiento vegetal (Fernández 2004). La capacidad para inhibir el crecimiento fúngico fue determinada en bioensayos *in vitro* en medio Patata Dextrosa Agar (PDA) (Oxoid). Se seleccionó, mediante estos bioensayos, la cepa AH2 entre todos los aislados probados, por su amplia capacidad para inhibir el crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos, tales como especies de los géneros *Botrytis*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Thielaviopsis* y *Botryosphaeria*. El poder estimulador del crecimiento vegetal fue comprobado mediante bioensayos de laboratorio, según los métodos descritos por Bashan y col., 1986, Fernández 1995 y Bashan 1998. A continuación se comprobó su capacidad para estimular el crecimiento vegetal mediante bioensayos en invernadero (Villaverde y col 2004). Por otra parte se comprobó que es capaz de solubilizar fosfatos, de producir ácido indol-3-acético y otras sustancias promotoras del crecimiento vegetal, así como sideróforos. Se determinó también la presencia del enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato desaminasa, a través del crecimiento en medios con ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) como única fuente de nitrógeno. Todas estas actividades corroboran su capacidad de estimular el crecimiento vegetal. Villaverde y col., 2004).

De igual manera, es objeto de esta invención, el procedimiento de obtención del producto para el tratamiento de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos, el cual consta de los siguientes pasos:

a) Crecimiento y esporulación de *Bacillus velezensis* cepa AH2 en un medio de cultivo adecuado mediante fermentación sumergida. En este paso se alcanzan valores de conteos celulares del orden de 10^9 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC.mL⁻¹)

b) Elaboración del formulado mediante la adición, al caldo fermentado con las células, de los otros componentes.

Este producto tiene buena estabilidad y conserva la viabilidad celular, sin pérdidas significativas, por al menos seis meses, a temperaturas no mayores de 30 °C. Las actividades antifúngica y estimuladora del crecimiento vegetal del formulado han sido comprobadas durante más de seis meses, conservando sus propiedades iniciales. En su aplicación en ensayos de invernadero ha demostrado efectividad en el tratamiento de enfermedades producidas por diferentes hongos fitopatógenos y para la estimulación del crecimiento vegetal. En los ensayos de campo también ha demostrado efectividad para el tratamiento de hongos fitopatógenos y particularmente de *Botrytis cinerea*.

Modo de realización preferente de la invención.

Propagación de la cepa *Bacillus velezensis* AH2

Se tomó una ampolla del aislado de *Bacillus velezensis* cepa AH2 conservado, se sembró en placas de medio PDA y se incubó a 30 °C durante 72 horas, para su activación. De esta placa se preparó un inóculo para el fermentador, tomándose una porción del cultivo con un asa, con la que se inoculó un matraz Erlenmeyer de 1000 mL, con 100 mL

de medio Caldo Patata Dextrosa (PD) y se incubó en agitación a 30 °C durante 16 h. Al cabo de este tiempo se inoculó el contenido del matraz en un fermentador Braun Biotech BIOSTAT® B de 3 L con medio PD, alcanzándose un volumen final de 2 L. Se llevó a cabo la fermentación durante 24 h a una velocidad de agitación de 600 r.p.m., una aireación de 1 v.v.m. (2 L.min⁻¹) y una temperatura de 30 °C. El pH se dejó variar libremente y al final tuvo un valor ≤ 5,5. Se alcanzó una concentración final de 2 x 10⁹ células.mL⁻¹ y aproximadamente un 80% de esporulación. La velocidad específica de crecimiento en fase exponencial (μ) fue de 0,40 h⁻¹. Las diferentes fases de crecimiento se desarrollaron durante las primeras 14 h de cultivo y a continuación se produjo el proceso de esporulación hasta las 24 h.

5 Una vez terminada la fermentación, se tomaron los 2 L de caldo fermentado y se procedió a añadir ácidos propiónico, sórbico y ascórbico al 0,5, 0,1 y 0,2 % respectivamente.

A este producto se le determinó periódicamente la viabilidad celular en medio Agar Nutritivo, comprobándose que mantiene más del 80% de viabilidad al cabo de seis meses de conservación a temperaturas no mayores de 30 °C

15 Con el producto elaborado siguiendo este esquema de fabricación, se llevaron a cabo todos los ensayos sobre la capacidad antifúngica y estimuladora del crecimiento vegetal con resultados muy satisfactorios.

Ensayos de antagonismo *in vitro*

20 Estos ensayos fueron realizados en placas de Petri. Se cultivaron los patógenos en placas de PDA por 48-72 horas a una temperatura de 25 °C. A continuación se tomó una porción de aproximadamente 1 cm diámetro, la cual fue colocada en el centro de una placa con medio PDA. Dicha placa fue inoculada en los extremos con *Bacillus velezensis* cepa AH2 mediante un asa. Posteriormente se incubó por 48-72 horas a 28 °C hasta observar la inhibición. En el caso del ensayo con *Botryosphaeria* sp., además se cultivó también en medio PD agitado, se centrifugó y se añadió el sobrenadante en pocillos de 1 cm² en la misma placa para determinar la capacidad antifúngica del caldo fermentado libre de células.

30 En la figura 1 se presentan los ensayos de antagonismo *in vitro* frente a algunos de los patógenos probados. Como puede observarse, existe una fuerte actividad inhibitoria del crecimiento fúngico en cada uno de los hongos fitopatógenos ensayados.

35 Por otra parte, el ensayo realizado con el sobrenadante del cultivo en el caso de *Botryosphaeria* sp. demuestra que la bacteria posee actividad antifúngica de carácter exocelular, tal como ocurre con otras muchas cepas del género *Bacillus*.

Ensayos de estimulación del crecimiento de plantas

40 Para comprobar la capacidad de estimular el crecimiento vegetal, se llevó a cabo un ensayo en plantas de pepino en condiciones de invernadero experimental en macetas. Como control positivo se utilizó el producto Bioprón PMC3 de Probelte S.A. dada su reconocida capacidad de estimular el crecimiento vegetal de diferentes cultivos.

Los resultados de este ensayo se presentan en la figura 2.

45 Como puede observarse en esta figura 2, hubo un notable incremento tanto en el Peso fresco total, como en el de la parte verde y el de la raíz. Estos valores aunque menores, no se diferenciaron estadísticamente con un 95% de confiabilidad con los obtenidos cuando se usó el Bioprón PMC3, mientras que sí fueron diferentes, como se observa en la gráfica, de los valores del control. Estos ensayos fueron realizados en otros cultivos tales como tomate y lechuga, obteniéndose resultados similares, lo que permitió comprobar la capacidad estimuladora de crecimiento vegetal de *Bacillus velezensis* cepa AH2 aislada en los laboratorios de investigación de Probelte S.A.

Ensayo de eficacia en condiciones de producción

55 Referencia del ensayo: AFS Tomate Mazarrón 2006

Nombre producto comercial: AFS

Cultivo: Tomate Amadeo (*Lycopersicon esc. M*)

60 Condiciones: Invernadero de producción, riego localizado

Marco de plantación: 1 m x 0.6 m

Densidad de plantación Aprox. 16600 plantas/ha

65

Tipo de suelo: Franco arenoso
 Materia activa: *Bacillus velezensis* cepa AH2, 10⁸ UFC/mL
 5 Uso genérico del producto: Fungicida
 Tipo de formulación: Líquido soluble
 10 Modo de aplicación: Pulverización foliar
 Patógeno objetivo del ensayo: *Botrytis cinerea*
 15 Producto de referencia: Karbel (Inscrito en el R.O.P.M.F. N° 23506 /14
 (Carbendazima 25% + Dietofencarb 25%.
 1 g/L de Probelte S.A.)

Tesis a ensayar

Tesis	Nombre	Dosis	Materia o materias activas
N ° 1	TESTIGO		
N ° 2	AFS	15 (mL/L.)	<i>Bacillus velezensis</i> 10 ⁸ UFC/mL
N ° 3	TRL	5 (mL/L)	<i>Trichoderma harzianum</i> + <i>T. viride</i> 10 ⁸ UFC/mL
N° 4	AFS	5 (L/ha)	<i>Bacillus velezensis</i> 10 ⁸ UFC/mL
N° 5	KARBEL	1 (g/L)	Carbendazima 25% + Dietofencarb 25%

20 Se realizó un ensayo con un diseño en bloques, completamente aleatorizado con cuatro repeticiones. El tamaño de la parcela elemental fue de 15 m² y 60 m² de área total por cada tratamiento.

25 Se realizaron 2 aplicaciones durante el ensayo mediante pulverización foliar, T₁ y T₂, en un volumen de caldo de 1200 L/ha. El primero, 2,5 meses después de plantado y el segundo a los 17 días de realizar el primero.

30 Para realizar la evaluación del ensayo, en la parcela elemental se contaron el número total de tomates que tiene cada planta, se anotaron los tomates con *Botrytis* y se le dió un valor de 1 a 4 dependiendo de la intensidad del ataque del patógeno y a partir de aquí se realizó el cálculo de la infestación. Durante el ensayo se llevaron a cabo 3 valoraciones, una valoración inicial V₀ y dos valoraciones una vez terminados los tratamientos, V₁ a los 7 días de realizado el segundo tratamiento y V₂ a los 15 días.

Resultados del ensayo.

35 Valoración V₀. No se observó síntoma alguno de la enfermedad

Primera valoración V₁ (Una semana después del segundo tratamiento)

BLOQUES	A	B	C	D	Media	Total
TESIS	<i>Infestación</i>					
TESTIGO	0,063	0,145	0,083	0,145	0,108	0,433
AFS (15 mL/L)	0	0,020	0	0,020	0,01	0,04
TRL (5 mL/L)	0	0,020	0,041	0	0,015	0,061
AFS (5 L/ha)	0,041	0,041	0,041	0,020	0,035	0,143
KARBEL (1g/L)	0	0,041	0	0,041	0,020	0,082

Eficacia ABBOT

TESIS	MEDIA	EFICACIA %
TESTIGO	0,108	
AFS (15 mL/L)	0,01	90,82
TRL (5 mL/L)	0,015	85,99
AFS (5 L/ha)	0,035	67,16
KARBEL (1g/L)	0,020	81,17

40

Test de Rangos Múltiples de Duncan

TESIS	Diferencias significativas
TESTIGO	b
AFS (15 mL/L)	a
TRL (5 mL/L)	a
AFS (5 L/ha)	b
KARBEL (1g/L)	a

Segunda valoración V₂ (Quince días después del segundo tratamiento)

BLOQUES	A	B	C	D	Media	Total
TESIS	<i>Infestación</i>					
TESTIGO	0,166	0,104	0,250	0,250	0,192	0,77
AFS (15 mL/L)	0	0,062	0,041	0,041	0,036	0,144
TRL (5 mL/L)	0	0,020	0,083	0,062	0,041	0,165
AFS (5 L/ha)	0,020	0,083	0,041	0,104	0,062	0,248
KARBEL (1g/L)	0,020	0,083	0,041	0,062	0,051	0,206

5

Eficacia ABBOT

TESIS	MEDIA	EFICACIA %
TESTIGO	0,192	
AFS (15 mL/L)	0,036	81,30
TRL (5 mL/L)	0,041	78,57
AFS (5 L/ha)	0,062	67,79
KARBEL (1g/L)	0,051	73,25

Test de Rangos Múltiples de Duncan

TESIS	Diferencias significativas
TESTIGO	b
AFS (15 mL/L)	a
TRL (5 mL/L)	a
AFS (5 L/ha)	a
KARBEL (1g/L)	a

10

Como puede observarse, en ambas valoraciones el tratamiento de AFS a 15 mL/L, produce una protección efectiva y superior al producto químico comercial usado como control. En todo momento la infestación se mantuvo bajo control y la efectividad del producto ensayado ha sido muy elevada. El análisis estadístico realizado arrojó que no existen diferencias significativas entre los productos biológicos ensayados y el producto químico control.

15

Conclusiones:

20

- En el ensayo realizado en Mazarrón (Murcia), en pulverización foliar para el control de *Botrytis cinerea* y observar el comportamiento del mismo en el futuro, AFS ha tenido una muy buena actividad respecto al testigo que no ha recibido ningún tratamiento.

25

- En la valoración V₁ se obtuvieron eficacias para la dosis de 15 mL/L del orden del 90%,

- En la valoración V₂ las eficacias fueron altas por, encima del 70% y en particular, en el caso de AFS por encima del 80%.

- Destacar que el nivel de incidencia del patógeno en el cultivo se mantiene bajo control con los tratamientos realizados.

30

- Al realizar el análisis de varianza en ambas valoraciones, sobre los parámetros medidos, al realizar el test de rangos múltiples de Duncan, se ha encontrado que no hay diferencias con un 99% de confiabilidad entre las dosificaciones en estudio y sí con respecto al testigo sin tratar.

35

- No se observó ningún síntoma de toxicidad en el cultivo a la dosis más alta.

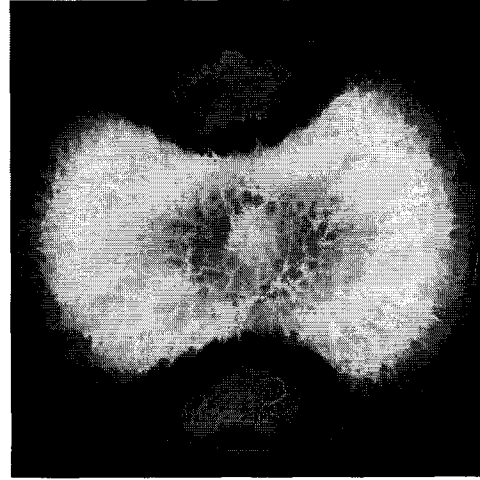
- Se concluye por tanto que AFS a dosificación de 15 mL/L es una formulación adecuada para el control de *Botrytis cinerea* en tomate.

REIVINDICACIONES

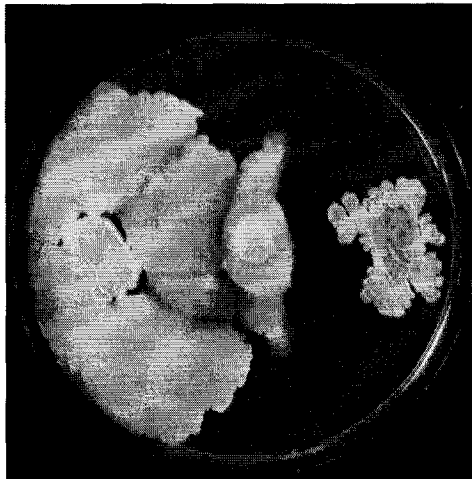
- 5 1. Un cultivo puro de la cepa denominada AH2 de la especie *Bacillus velezensis*, así como sus mutantes caracterizada por presentar una elevada actividad antifúngica y particularmente frente a hongos fitopatógenos dada su capacidad de producir sustancias antagonistas, así como una buena capacidad para estimular el crecimiento vegetal, siendo la cepa capaz de solubilizar fosfatos, producir ácido indol-3-acético y sideróforos, así como capaz de crecer en ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) como única fuente de nitrógeno, habiendo sido depositada dicha cepa en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número CECT-7221
- 10 2. Un producto para el control biológico de hongos fitopatógenos y estimulador del crecimiento vegetal caracterizado por contener células viables de *Bacillus velezensis* cepa AH2 (CECT-7221).
3. Un producto para el control biológico de hongos fitopatógenos y estimulador del crecimiento vegetal según la reivindicación 2, caracterizado porque las citadas células viables se encuentran en forma de esporas.
- 15 4. Un producto para el control biológico de hongos fitopatógenos y estimulador del crecimiento vegetal según las reivindicaciones 2 ó 3, caracterizado porque las células microbianas son obtenidas mediante un proceso de fermentación sumergida en la cual se alcanzan concentraciones de esporas mayores de 10^9 UFC/mL.
5. Un producto para el control biológico de hongos fitopatógenos y estimulador del crecimiento vegetal según las reivindicaciones 2 ó 3, caracterizado por contener una concentración de esporas total mayor de 10^9 UFC/mL.
- 20 6. Un producto para el control biológico de hongos fitopatógenos y estimulador del crecimiento vegetal según una de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado por contener, además de las células bacterianas, el sobrenadante del cultivo con materia orgánica y sustancias con actividad antifúngica entre otras.
7. Un producto para el control biológico de hongos fitopatógenos y estimulador del crecimiento vegetal según la reivindicación 2, caracterizado por tener una estabilidad a temperatura ambiente no menor de 6 meses.
- 25 8. Un producto para el control biológico de hongos fitopatógenos y estimulador del crecimiento vegetal según la reivindicación 7, caracterizado porque la estabilidad es garantizada mediante el empleo de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano.
9. Un producto para el control biológico de hongos fitopatógenos y estimulador del crecimiento vegetal según las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado porque la sustancia inhibidora del crecimiento microbiano es seleccionada entre uno o varios ácidos orgánicos utilizados como conservantes.
- 30 10. Un producto para el control biológico de hongos fitopatógenos y estimulador del crecimiento vegetal según las reivindicaciones 2 a 9 caracterizado porque presenta una elevada actividad al ser aplicado mediante pulverización foliar.



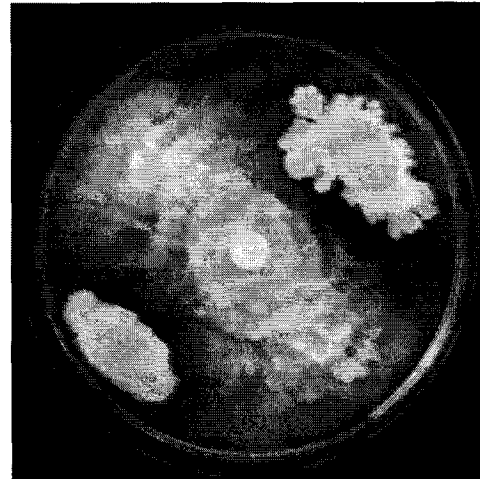
Botrytis sp.



Fusarium sp.



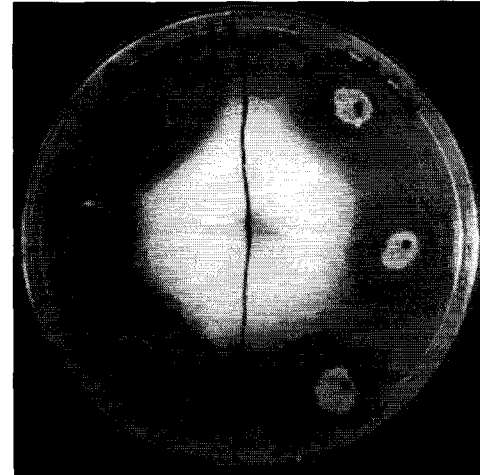
Pythium sp.



Phytophthora sp.

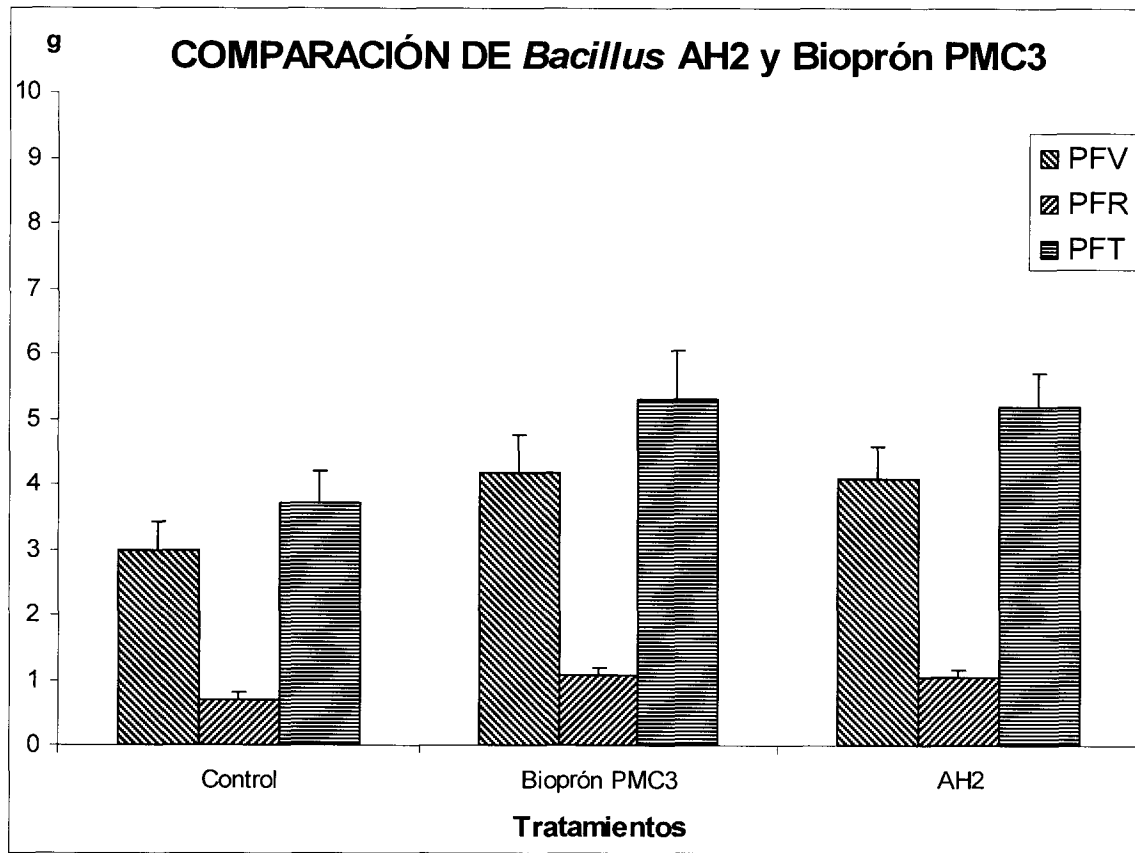


Rhizoctonia sp.



Botryosphaeria sp.

Figura 1



Leyenda: PFV: Paso fresco verde, PFR: Peso fresco raíz, PFT: Peso fresco total

Figura 2