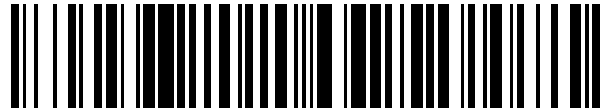


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 518 924**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A01N 63/00** (2006.01)

**A01P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2009 E 09794161 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2311936**

54 Título: **Nuevo microorganismo y agente de control de enfermedades de las plantas usando dicho microorganismo**

30 Prioridad:

**11.07.2008 JP 2008181449**

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

**05.11.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF YAMANASHI (100.0%)  
4-4-37, Takeda, Kofu-shi  
Yamanashi 400-8510, JP**

72 Inventor/es:

**TAKAYANAGI, TSUTOMU;  
SUZUKI, SHUNJI y  
FURUYA, SEIICHI**

74 Agente/Representante:

**TORNER LASALLE, Elisabet**

**ES 2 518 924 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

Nuevo microorganismo y agente de control de enfermedades de las plantas usando dicho microorganismo.

Campo técnico

5 La presente invención versa sobre una nueva especie de *Bacillus subtilis* y sobre un agente de control de enfermedades de las plantas que usa la célula bacteriana y el cultivo de este microorganismo.

Técnica antecedente

10 Recientemente ha habido un mayor interés en técnicas biológicas de control que usan un pesticida biológico, lo que tiene una menor carga ambiental y un mayor nivel de seguridad para seres humanos y animales en comparación con los pesticidas químicos. Sin embargo, un pesticida biológico tiene un efecto menos instantáneo y un efecto menos terapéutico en comparación con los pesticidas químicos y puede controlar únicamente una gama limitada de hongos patógenos, y también pierde la eficacia del propio pesticida biológico cuando se usa en combinación con un pesticida químico. Por lo tanto, la cuota de mercado de los pesticidas químicos permanece en la actualidad en solo el 0,4% del mercado total de pesticidas.

15 La técnica que usa un pesticida biológico utiliza un organismo que sea un enemigo natural de los microorganismos y plagas fitopatógenos que causan las enfermedades de las plantas. Convencionalmente se ha usado el *Bacillus subtilis* como pesticida biológico contra los hongos que causan la podredumbre gris en berenjenas, tomateras o vides, dado que tiene acciones antagónicas tales como inhibición del crecimiento y una acción fungicida sobre los hongos fitopatógenos.

20 Por ejemplo, un procedimiento para controlar enfermedades de las plantas que incluye una fracción de esporas preparada a partir de un cultivo de bacterias *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis*, de modo que contenga el 50% o más en peso de esporas con respecto al peso seco, conocida convencionalmente como pesticida biológico que usa el *Bacillus subtilis* (véase la Bibliografía de patentes 1). Además, para controlar las enfermedades de las plantas causadas por *Phytophthora*, se conoce un agente de control que incluye la célula bacteriana o el cultivo de bacterias *Bacillus* tales como *Bacillus licheniformis*, y, además, ácidos y sales orgánicos del mismo producidos por las bacterias como ingrediente activo (véase la Bibliografía de patentes 2).

25 Además, se conoce un agente de control de enfermedades de las plantas que incluye la célula bacteriana o el cultivo de *Bacillus sphaericus* (véase la Bibliografía de patentes 3), y también se conoce un agente de control de enfermedades de las plantas que usa cepas específicas de *Bacillus subtilis* como ingrediente activo (véanse la Bibliografía de patentes 4 y 5).

30 Sin embargo, en el caso de la aplicación a una vid, los efectos de los agentes convencionales recién mencionados de control de enfermedades de las plantas, son arbitrados por acciones antagónicas por parte de bacterias *Bacillus* que ocupan la zona de nutrición o viva de los tejidos de la vid. Por lo tanto, aunque se produce cierto efecto preventivo pulverizando antes del brote de enfermedades, los agentes no tienen ningún efecto terapéutico tal como una acción bactericida y, así, no han podido ser usados después del brote de enfermedades.

35 Además, los agentes convencionales recién mencionados de control de enfermedades de las plantas son efectivos únicamente para los hongos que causan la podredumbre gris de la vid entre los hongos patógenos de las tres enfermedades más comunes de la vid: la podredumbre gris, el mildiu y la podredumbre blanca de la vid. Así, no cabe esperar que tengan un efecto de control sobre los hongos que causan el mildiu y la podredumbre blanca; únicamente para la podredumbre gris de la vid u otros hongos patógenos de la vid.

40 Además, aunque los agentes convencionales recién mencionados de control de enfermedades de las plantas se asientan en las hojas de la vid, el nivel de asentamiento en los pericarpios fue bajo. También fue difícil usar un pesticida químico por razones de seguridad, dado que los pericarpios de la uva también se ponen en la boca, y el control de enfermedades tales como la podredumbre gris y la podredumbre blanca, que también se dan en los frutos, ha resultado difícil.

45 Lista de citas

Bibliografía de patentes

Bibliografía de patentes 1:

Solicitud de patente japonesa en trámite nº Hei. 8-175919

50

Bibliografía de patentes 2:

Solicitud de patente japonesa en trámite nº 2001-206811

Bibliografía de patentes 3:

Solicitud de patente japonesa en trámite nº 2003-277210

5 Bibliografía de patentes 4:

Solicitud de patente japonesa en trámite nº Hei. 6-133763

10 Bibliografía de patentes 5:

Solicitud de patente japonesa en trámite nº Hei. 5-51305

Véanse también los documentos WO 00/58442, WO98/50422, WO 98/21964 y WO 2008/009795.

Sumario de la invención

Problemas que han de ser resueltos por la invención

15 Por lo tanto, el problema que ha de ser resuelto por la invención es proporcionar un microorganismo del que cabe esperar que tenga tanto un efecto preventivo como un efecto terapéutico y que pueda ser aplicado a diversos hongos fitopatógenos, y cuyos efectos no se reducen ni siquiera cuando se use en combinación con un pesticida químico, y un agente de control de enfermedades de plantas que use el microorganismo.

Medios para resolver los problemas

20 Para resolver el problema anteriormente mencionado, el microorganismo según la presente invención se caracteriza por ser la cepa KS1 (NITE BP-569) de *Bacillus subtilis*.

Además, el agente de control de enfermedades de las plantas según la presente invención se caracteriza por incluir el cultivo y/o la célula bacteriana de microorganismo de la cepa KS1 recién mencionada de *Bacillus subtilis* como ingrediente activo.

25 Además, el agente de control de enfermedades de las plantas de la presente invención actúa eficientemente sobre los hongos patógenos que aparecen en las hojas o en los frutos de las vides. A título de ejemplo, el agente de la invención de control de enfermedades de las plantas es efectivo contra los hongos que causan la podredumbre gris, los hongos que causan el mildiu, los hongos que causan la podredumbre blanca y similares.

30 Además, dado que el agente de control de enfermedades de las plantas según la presente invención tiene resistencia contra los pesticidas químicos, puede ser usado en combinación con un pesticida químico.

Efectos de la invención

35 Cabe esperar que la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* según la presente invención y el agente de control de enfermedades de las plantas que incluye el cultivo o la célula bacteriana de microorganismo de la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* como ingrediente activo tengan un efecto preventivo y un efecto terapéutico en una amplia gama de hongos fitopatógenos tales como los hongos que causan el mildiu, los hongos que causan la podredumbre gris y los hongos que causan la podredumbre blanca.

Breve descripción de los dibujos

40 [Fig. 1] fotomicrografía que muestra las puntas de hifas de los hongos que causan la podredumbre gris de la vid cuando los hongos se cultivaron en un cultivo dual con la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* de la presente invención.

[Fig. 2] fotomicrografía que muestra las puntas de hifas de los hongos que causan la podredumbre blanca de la vid cuando los hongos se cultivaron en un cultivo dual con la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* de la presente invención.

Modo de llevar a cabo la invención

45 La presente invención será descrita con detalle a continuación. La cepa KS1 de *Bacillus subtilis* según la presente invención es una bacteria descubierta en pericarpios de uva y tiene características tales como un alto nivel de asentamiento en las hojas de la vid. En lo que sigue se enumeran las propiedades bacteriológicas de la cepa KS1 de *Bacillus subtilis*.

A. Morfología de las bacterias

50 (1) Forma: bacilo

(2) Tamaño: 0,8 × 3 a 5 µm.

(3) Motilidad: no

B. Morfología de la colonia (incubación a 31°C durante 2 días)

- 5 (1) Nombre del medio: medio de agar SCD  
 (2) Forma: círculo irregular  
 (3) Tamaño: 5 mm  
 10 (4) Elevación: plana  
 (5) Forma del margen: ondulada  
 (6) Forma de la superficie: arrugada  
 15 (7) Textura: mucoide  
 (8) Transparencia: opaca  
 20 (9) Lustre: lustre apagado  
 (10) Color: Beis claro

C. Propiedades fisiológicas

[Tabla 1]

1	Tinción de Gram	(+)	22	L-xilosa	(-)	44	Lactosa	(-)
2	Esporulación	(+)	23	Adonitol	(-)	45	Melibiosa	(-)
3	Catálisis	(+)	24	Metil-β-D-xilopiranosido	(-)	46	Sacarosa	(+)
4	β-galactosidasa	(+)	25	Galactosa	(-)	47	Trehalosa	(+)
5	Arginina dihidrolasa	(-)	26	Glucosa	(+)	48	Inulina	(-)
6	Lisina decarboxilasa	(-)	27	Fructosa	(+)	49	Melecitosa	(-)
7	Ornitina decarboxilasa	(-)	28	Manosa	(+)	50	Rafinosa	(-)
8	Utilización de citratos	(-)	29	Sorbosa	(+)	51	Almidón	(-)
9	Producción de H <sub>2</sub> S	(-)	30	Ramnosa	(-)	52	Glucógeno	(-)
10	Ureasa	(-)	31	Dulcitol	(-)	53	Xilitol	(-)
11	Triptófano deaminasa	(-)	32	Inositol	(+)	54	Gentiobiosa	(-)
12	Producción de indol	(-)	33	Manitol	(+)	55	D-turanosa	(+)
13	Producción de acetoina	(+)	34	Sorbitol	(+)	56	D-lixosa	(-)
14	Licueción de gelatinas	(+)	35	Metil-α-D-manopiranosido	(-)	57	D-tagatosa	(-)
15	Reducción/fermentación/ oxidación de nitratos	(+)	36	Metil-α-D-glucopiranosido	(+)	58	D-fucosa	(-)
16	Glicerol	(+)	37	N-acetilglucosamina	(+)	59	L-fucosa	(-)
17	Eritritol	(-)	38	Amigdalina	(-)	60	D-arabitol	(-)
18	D-arabinosa	(-)	39	Arbutina	(-)	61	L-arabitol	(-)
19	L-arabinosa	(+)	40	Esculina	(+)	62	Gluconato	(-)
20	Ribosa	(+)	41	Salicina	(-)	63	2-ketogluconato	(-)
21	D-xilosa	(+)	42	Celobiosa	(-)	64	5-ketogluconato	(-)
			43	Maltosa	(+)			

(+): Positivo; (-): Negativo; (±): Falso positivo

25 La secuencia de bases de ADNr correspondiente a la subunidad 16S es como sigue.

[ID SEC N° 1]

30 GACGAACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGG  
 GAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA  
 CCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT  
 GGTGTTTGAACCGCATGGTTCGAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCAC  
 TTACAGATGGACCCGCGGCATAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCAC  
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGAACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG  
 ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC  
 35 GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTT  
 TCGGATTGTAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAG  
 GGGGCGACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC

5 Esta cepa bacteriana fue identificada como *Bacillus subtilis* en función de las propiedades bacteriológicas mencionadas más arriba y como ID SEC N° 1, la secuencia de bases de 16SADNr, y designada cepa KS1 de *Bacillus subtilis*. Dicho sea de paso, esta cepa KS1 de *Bacillus subtilis* fue depositada en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación, Depósito de Patentes de Microorganismos (2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japón) el 13 de mayo de 2008 y depositada con el número de acceso "NITE P-569". La cepa fue convertida en un depósito internacional bajo el Tratado de Budapest el 20 de mayo de 2009 y recibió el número de acceso "NITE BP-569".

10 Dicho sea de paso, la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* según la presente invención no está limitada a la secuencia de bases que es completamente idéntica a la secuencia de bases de 16SADNr mostrada en la ID SEC N° 1 descrita más arriba. La cepa KS1 de *Bacillus subtilis* de la invención también incluye aquellas que, incluso cuando las cepas estén compuestas de una secuencia de bases en la que una o varias bases de la secuencia de bases estén borradas, sustituidas, o se les añadan otras bases, tengan características similares a las de la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* en cuanto a una acción de control de enfermedades de las plantas, especialmente una acción de control de enfermedades de la vid.

15 El medio de cultivo que se puede usar en la presente invención no está limitado en particular, con la condición de que la cepa de la presente invención pueda crecer en el cultivo. Por ejemplo, se usan como fuente de carbono la glucosa, la sacarosa, la caseína, el extracto de levadura, el extracto de carne y similares, y se usan como fuente de nitrógeno el extracto de levadura, el extracto de carne, la polipeptona, la peptona, la tripsina y similares. También se añaden como nutrientes adicionales sodio, potasio, magnesio, hierro, calcio y similares.

20 En la presente invención, el cultivo puede llevarse a cabo en condiciones aeróbicas, por ejemplo con aireación-agitación, agitando el cultivo, mediante un procedimiento de cultivo sólido o similares. Aunque la condición de cultivo no está limitada en particular, son adecuadas las temperaturas que oscilen entre 30 y 37°C, un pH que oscile entre 6,5 y 7,5, y lapsos temporales que oscilen entre 12 y 48 horas.

25 La cepa KS1 de *Bacillus subtilis* cultivada según se ha descrito más arriba puede ser usada sin ser separada del cultivo, o ser usada después de la separación de las células bacterianas por centrifugación. Además, en el caso de usar esta cepa como agente de control de enfermedades de las plantas, puede ser formulada con diversos aditivos tales como un tensioactivo (por ejemplo, monoaurato de sorbitán, denominado comúnmente Tween20) y un dispersor (por ejemplo, SABUMAHJI de Syngenta Japan) y usada como gránulos, un concentrado emulsionable un polvo dispersable en agua, un concentrado en suspensión acuosa y similares.

30 La célula bacteriana o el cultivo así preparado de la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* pueden ser aplicados al cuerpo o al suelo de una planta, controlando con ello las enfermedades de la planta. El agente de control de la presente invención tiene un efecto significativo en el control de las enfermedades de la vid causadas, por ejemplo, por los hongos que causan la podredumbre gris de la vid, los hongos que causan la podredumbre blanca de la vid, los hongos que causan la podredumbre blanca de la raíz de la vid, los hongos que causan el mildiu de la vid y similares.  
35 Además, el agente de control también tiene efecto en el control de los hongos que causan la podredumbre gris y los hongos que causan antracnosis que infectan plantas distintas de la vid, tales como fresales y pepinos.

40 El procedimiento de aplicación del agente de control se selecciona a lo apropiado dependiendo de la forma de la formulación, el tipo de la planta y el tipo y el grado de la enfermedad. Por ejemplo, pueden seleccionarse un procedimiento en el que se use un agente licuado de control para la aplicación al suelo de la formulación líquida o la aplicación aérea de la formulación líquida, un procedimiento de pulverización o aplicación directas del agente de control en las hojas de las plantas, además de un procedimiento por inmersión en una solución del agente de control, o similares.

45 Aunque la cantidad de la aplicación varía dependiendo, por ejemplo, del tipo de enfermedades y de las plantas para la aplicación, el agente de control se aplica con una concentración de  $1,5 \times 10^8$  células/mL (con un contenido de 0,02% de Tween20) y usando 5 litros por área de terreno.

### Ejemplos

A continuación, la presente invención será descrita en detalle en base a los Ejemplos.

#### Ejemplo 1: Ejemplo de cultivo

50 Una porción de la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* según la presente invención, tomada por medio de un asa de platino, fue inculada en un medio de caldo (10 g de extracto de carne, 10 g de peptona, 5 g de cloruro sódico y 1 L de agua) e incubada con agitación a 150 rpm durante 12 horas a 37°C para obtener el medio de cultivo. Las células bacterianas de la cepa KS1 fueron cosechadas de este medio de cultivo mediante centrifugación. A continuación, las células bacterianas cosechadas de la cepa KS1 fueron ajustadas con agua hasta  $1,3$  a  $1,5 \times 10^8$  células/mL y se añadió Tween20 (a una concentración final de 0,02%) como tensioactivo, formulándose con ello un concentrado en suspensión acuosa.  
55

## Ejemplo 2: Aplicación a bacterias patógenas, ensayo 1

- En este ejemplo se llevó a cabo un ensayo para determinar el efecto de control de la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* en los hongos que causan el mildiu de la vid. Se pulverizó el concentrado en suspensión acuosa preparado en el Ejemplo 1 recién descrito en vides (emparradas) Koshu de diez años plantadas en el campo experimental del Instituto de Enología y Viticultura, Universidad de Yamanashi, y se examinó el efecto. Dado que desde 2005 se viene llevando a cabo una agricultura completamente libre de pesticidas en este campo experimental (Heisei 17), el mildiu de la vid se produce con frecuencia todos los años. Así, el concentrado en suspensión acuosa mencionado más arriba fue pulverizado en brotes tiernos de vides una vez por semana, cada semana desde el 11 de mayo hasta el 17 de agosto de 2007 (Heisei 19). La tasa de aplicación fue de aproximadamente cinco litros por área de terreno.
- En paralelo, como ejemplo comparativo para este ejemplo, un pesticida microbiano disponible comercialmente, se pulverizó, con la misma concentración y a la misma frecuencia, un polvo Botokiller (marca registrada, Idemitsu Kosan Co., Ltd.) dispersable en agua. También se comparó una zona no tratada en la que no se pulverizó ningún agente.
- Se examinó la incidencia de mildiu el 21 de agosto de 2007 (Heisei 19). La incidencia de la enfermedad (%) fue calculada en función del número de hojas que habían desarrollado síntomas de mildiu, y también se calculó de la severidad de la enfermedad (cm<sup>2</sup>) en función del área total con síntomas en el campo experimental. Se muestran estos resultados en la Tabla 2.

[Tabla 2]

	Incidencia de la enfermedad (%)	Severidad de la enfermedad (cm <sup>2</sup> )
B. subtilis KS1	10	4
Polvo Botokiller dispersable en agua	50	301
Zona no tratada	60	299

- Como resulta claro por los resultados de la Tabla 2 recién descrita, se halló que la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* tiene un efecto de control, en particular un nivel muy alto de efecto preventivo sobre los hongos que causan el mildiu de la vid.

## Ejemplo 3: Aplicación a hongos patógenos, ensayo 2

- En este ejemplo se llevó a cabo un ensayo para determinar el efecto de control de la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* en los hongos que causan la podredumbre gris y los hongos que causan la podredumbre blanca. En primer lugar, se cultivaron de antemano los hongos patógenos que habían de examinarse (los hongos que causan la podredumbre gris y los hongos que causan la podredumbre blanca) en un medio de APD (uno que contiene extracto de patata y dextrosa en agar) a 25°C durante aproximadamente 5 días. A continuación, se vació un disco de 6 mm de diámetro del micelio crecido usando un horador y se lo colocó en el centro de una nueva placa de Petri que contenía el medio de APD. Además, se llevó a cabo un cultivo dual realizando un frotis de la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* en el extremo de la misma placa de Petri, y se monitorizó la interacción entre el césped fúngico de los hongos examinados y la cepa KS1 de *Bacillus subtilis*.

- Las Figuras 1 y 2 son fotomicrografías (200×) que muestran las puntas de hifas de los hongos examinados después de 3 días de cultivo dual a 25°C. Estas fotografías muestran el estado en el que las puntas de las hifas tanto de los hongos que causan la podredumbre gris como de los hongos que causan la podredumbre blanca se hincharon y se rompieron y quedó inhibido el crecimiento de los hongos patógenos. Se supone que uno de los mecanismos de esta inhibición del crecimiento es resultado de sustancias fungicidas producidas por la cepa KS1 de *Bacillus subtilis*. Según queda claro por este ejemplo, se confirmó que la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* tenía un efecto de control, particularmente un efecto terapéutico debido a una acción fungicida, en los hongos que causan la podredumbre gris o los hongos que causan la podredumbre blanca, que están entre los principales hongos patógenos de la vid.

## Ejemplo 4: Ensayo de resistencia a los fármacos

- En este ejemplo se llevó a cabo un ensayo para determinar la resistencia de la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* a los pesticidas químicos. En primer lugar, se preparó en una placa de Petri el medio YBS (uno que contiene extracto de levadura y extracto de carne en agar) que contenía el pesticida químico de interés. La concentración (ppm) del pesticida químico en este momento era la misma que una concentración de aplicación general. A continuación, se realizó un frotis de la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* en la superficie del medio recién mencionado que contenía el pesticida químico y se incubó a 37°C durante 2 días. Como área de control, se llevó a cabo, en paralelo, un ensayo de la resistencia de *Bacillus subtilis* aislado de un polvo Botokiller dispersable en agua a los pesticidas químicos. En este caso, la suspensión del polvo Botokiller dispersable en agua fue esparcida sobre el medio YBS y se consideró que las bacterias que aparecieron después de la incubación durante la noche a 37°C eran las bacterias que constituían un polvo Botokiller dispersable en agua. En el ensayo de resistencia, se realizó un frotis de las bacterias que constituían un polvo Botokiller dispersable en agua sobre la superficie del medio que contenía un pesticida químico y se incubaron a 37°C durante 2 días, como en el caso de la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* anteriormente mencionada.

Tras 2 días de incubación a 37°C, la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* y las bacterias que constituían un polvo Botokiller dispersable en agua fueron observadas macroscópicamente para ver si habían crecido o no. Cuando se observó crecimiento de las bacterias (cuando las bacterias habían crecido mucho), se consideró que eran resistentes al pesticida químico. La Tabla 3 indica los resultados de los ensayos de resistencia sobre 11 pesticidas químicos que en la actualidad se usan comúnmente en viticultura.

[Tabla 3]

Pesticidas químicos usados en viticultura	Concentración (ppm)	<i>B. subtilis</i> KS1	<i>B. subtilis</i> usado en un polvo Botokiller dispersable en agua
Azoxistrobina	150	+	+
Benomilo	200	+	+
Carbarilo	850	+	+
Dietofencarb	50	+	+
Fenhexamida	100	+	+
Fenitrotina	400	+	+
Imidacloprida	100	+	+
Maneb	100	+	-
Permetrina	100	+	+
Procimidona	20	+	+
Tiofanato metílico	100	+	+
+ Buen crecimiento – Ningún crecimiento			

Según los resultados del ensayo, la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* de la presente invención mostró Resistencia a todos los pesticidas químicos objeto de ensayo y también mostró resistencia al Maneb (nombre del producto: polvo Maneb-Dithane M dispersable en agua) que se usado de forma generalizada, especialmente para el mildiu, la podredumbre blanca y similares. Por lo tanto, se sugiere la posibilidad de una aplicación combinada efectiva de la cepa KS1 con los pesticidas químicos. Dicho sea de paso, las bacterias que constituyen un polvo Botokiller dispersable en agua no mostraron resistencia alguna al Maneb recién mencionado.

Aplicabilidad industrial

La cepa KS1 de *Bacillus subtilis* de la presente invención es efectiva contra una amplia variedad de enfermedades de la vid, tales como los hongos que causan el mildiu, los hongos que causan la podredumbre gris y los hongos que causan la podredumbre blanca. Este amplio efecto de control significa que la cepa KS1 puede disminuir el número o la cantidad de aplicación de los agentes que en la actualidad se aplican para controlar enfermedades de la vid (pesticidas químicos y pesticidas biológicos). Dado que la cepa KS1 produce un efecto tal como aportación a la reducción de la mano de obra o los costes en viticultura, además de la conservación medioambiental, tiene aplicabilidad industrial como pesticida biológico.

Listado de secuencias

<110> UNIVERSIDAD DE YAMANASHI

<120> MICROORGANISMO NOVEDOSO Y AGENTE DE CONTROL DE ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS QUE USA EL MICROORGANISMO

25 <130> C15249EP

<140> EP09794161.1

<141> 2009-07-03

<150> JP2008-181449

<151> 2008-07-11

30 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 499

<212> ADN

35 <213> *Bacillus subtilis* KS1

<400> 1

gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc ggacagatgg gagcttgctc 60  
 cctgatgtta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgcctgta agactgggat 120

## ES 2 518 924 T3

5

```
aactccgga aaccgggct aataccgat ggttgttga accgcatggt tcgaacataa 180
aaggtggctt cggctaccac ttacagatgg acccgggcg cattaactag ttggtgaggt 240
aatggctcac caaggcgacg atgcgtagcc gaacctgaga gggatgatcg ccacactggg 300
actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc gcaatggacg 360
aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg atgaaggttt tcggattgta aagctctggt 420
gtagggaag aacaagtacc gttcgaatag gggcgacct tgacggtacc taaccagaaa 480
gccacggcta actacgtgc
```



**REIVINDICACIONES**

1. Un microorganismo aislado, concretamente la cepa KS1 (NITE BP-569) de *Bacillus subtilis*, perteneciente al *Bacillus subtilis*.
- 5 2. Un agente de control de enfermedades de las plantas que comprende un cultivo y/o una célula bacteriana de microorganismo de la cepa KS1 (NITE BP-569) de *Bacillus subtilis* como ingrediente activo.
3. El agente de control de enfermedades de las plantas según la reivindicación 2 en el que el cultivo y/o la célula bacteriana de microorganismo de la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* actúan como un hongo patógeno que aparece en las hojas o en los frutos de la vid.
- 10 4. El agente de control de enfermedades de las plantas según las reivindicaciones 2 o 3 en el que el cultivo y/o la célula bacteriana de microorganismo de la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* actúan como un hongo que causa la podredumbre gris, un hongo que causa mildiu y un hongo que causa podredumbre blanca.
5. El agente de control de enfermedades de las plantas según la reivindicación 2 en el que el cultivo y/o la célula bacteriana de microorganismo de la cepa KS1 de *Bacillus subtilis* tienen resistencia a los pesticidas químicos.

Fig. 1

Bacterias causantes de la podredumbre gris de la vid

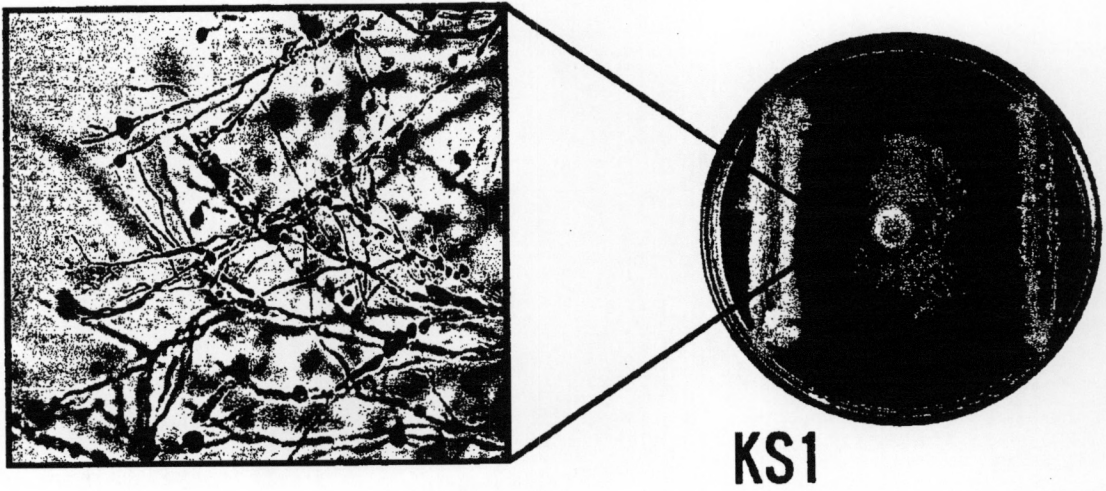


Fig. 2

Bacterias causantes de la podredumbre blanca de la vid

