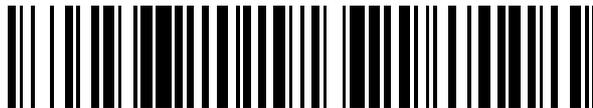


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 716**

21 Número de solicitud: 201330685

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

13.05.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.11.2014

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT DE GIRONA (100.0%)
Plaça Sant Domenech, 3 Edifici les Àligues
17071 Girona ES**

72 Inventor/es:

**MONTESINOS SEGUÍ, Emilio;
BONATERRA CARRERAS, Anna;
ROSELLÓ PRADOS, Gemma;
FRANCÉS ORTEGA, Jesús y
MONTESINOS BARREDA, Laura**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

54 Título: **Cepa de Lactobacillus plantarum para el control del fuego bacteriano**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a la cepa Lactobacillus plantarum TC92, así como mutantes de la misma, y al uso de dicha cepa como plaguicida en el control del fuego bacteriano en plantas de la familia Rosaceae. Aspectos adicionales de la invención se refieren a métodos de obtención de la cepa L. plantarum TC92, composiciones plaguicidas que comprenden dicha cepa y un extracto de L. plantarum TC92 con actividad antagonista frente a E. amylovora que es útil para el control del fuego bacteriano. Por último la invención se refiere a un método de control biológico del fuego bacteriano en plantas de la familia Rosaceae que comprende tratar estas plantas con la cepa L. plantarum TC92 o el extracto de L. plantarum TC92.

ES 2 522 716 A1

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Lactobacillus plantarum* para el control del fuego bacteriano

5 La presente invención se refiere al campo de los fitosanitarios, concretamente a una nueva cepa de *Lactobacillus plantarum* y a su uso en el control biológico del fuego bacteriano en frutales de pepita y plantas ornamentales.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10

Entre el 38 y el 42% de las pérdidas de producción de los cultivos a nivel mundial se deben a agentes bióticos (plagas, enfermedades y malas hierbas). Para controlar dicha problemática, la agricultura convencional utiliza productos fitosanitarios (insecticidas, fungicidas, bactericidas, herbicidas), obtenidos mediante síntesis química. Sin embargo, el
15 impacto de un uso masivo de productos fitosanitarios sintéticos en el medio ambiente y en la salud de los consumidores ha ocasionado una reorientación de la protección de los cultivos hacia un manejo integrado de plagas (MIP), que supone una estrategia que usa una gran variedad de métodos complementarios: físicos, mecánicos, químicos, biológicos, genéticos, legales y culturales, para el control de las plagas. El MIP aspira a reducir o eliminar el uso de
20 fitosanitarios sintéticos y de minimizar el impacto al medio ambiente.

En el campo de las enfermedades de las plantas, el fuego bacteriano de los frutales de pepita y plantas ornamentales afines, causado por *Erwinia amylovora*, es una de las enfermedades más antiguas, distribuída por todo el mundo y que causa grandes pérdidas
25 económicas. El control del fuego bacteriano se realiza mediante el tratamiento de las plantas con antibióticos (por ejemplo, estreptomicina o tetraciclina) o bien mediante compuestos derivados de cobre (caldo bordelés, oxiclورو, óxido o hidróxido de cobre). Sin embargo, en muchos países, en concreto en la Unión Europea, el uso de antibióticos en agricultura no está autorizado. Además, la eficacia de los tratamientos con antibióticos en el control del
30 fuego bacteriano está limitada por el desarrollo en *E. amylovora* de resistencia plasmídica. Por otro lado, los compuestos cúpricos presentan un impacto ambiental negativo debido a su toxicidad y acumulación en el medio ambiente.

En este sentido, el nuevo marco legislativo de los productos fitosanitarios en la Unión
35 Europea regulado por la directiva 2009/128/CE y el Reglamento (CE) 1107/2009 del

Parlamento Europeo y del Consejo relativos al uso sostenible y comercialización de los plaguicidas, tiene como objetivo principal la reducción del riesgo del uso de productos fitosanitarios a través de una gestión integrada de plagas y enfermedades, y de la protección del medio ambiente, estableciendo que los medios de lucha fitosanitaria deberán ser preferentemente biológicos y físicos.

Por lo tanto queda claro que existe una presión legislativa y una tendencia en agricultura hacia el uso de medios de protección no basados en plaguicidas de síntesis química. Así, en las nuevas técnicas de protección de plantas se prefiere el uso de productos biológicos, mayoritariamente microorganismos y extractos naturales juegan un papel importante. En el caso del control de las enfermedades causadas por bacterias, como el fuego bacteriano de los frutales y plantas ornamentales, la escasa disponibilidad de productos químicos y sus limitaciones de uso ha estimulado el desarrollo de agentes bioplaguicidas de control biológico como ingredientes activos.

Actualmente a nivel mundial se dispone de algunos productos plaguicidas para el control biológico del fuego bacteriano que incluyen en sus materias activas cepas de diversas bacterias como *Pseudomonas fluorescens* A506, *Pantoea vagans* C9-1, *P. agglomerans* E325, *P. agglomerans* P10c, *Bacillus subtilis* QST713, y *B. subtilis* BD170 (Johnson, K. y Stockwell, V.O., "Management of fire blight: a case study in microbial ecology", Annu. Rev. Phytopathol. 1998, vol. 36, pp. 227-248). En Europa sólo se ha autorizado hasta el momento la cepa de *Bacillus subtilis* QST713 (Bonaterra A *et al*, "Prospects and limitations of microbial biopesticides for control of bacterial and fungal pomefruit tree diseases", Trees 2012, vol. 26, pp. 215-226).

Sin embargo, la tecnología actual de control del fuego bacteriano basada en bioplaguicidas microbianos no está exenta de problemas relacionados con (1) la producción de metabolitos secundarios por parte de la mayoría de las cepas, (2) dudas respecto a su bioseguridad, (3) falta de una adecuada aptitud ecológica para la colonización de las plantas, (4) eficacia menor que la de los antibióticos, y (5) dificultades técnicas en la producción de formulados con una vida útil larga, comparable a la de los productos fitosanitarios convencionales.

En primer lugar, varios de los bioplaguicidas descritos para control biológico del fuego bacteriano exhiben un mecanismo de acción consistente en la producción de metabolitos secundarios como las pantocinas o ciclolipopéptidos. Ejemplos de estos bioplaguicidas son

Pantoea vagans C9-1, *P. agglomerans* E325, *P. agglomerans* P10c, *Bacillus subtilis* QST713, y *B. subtilis* BD170. Sin embargo, se ha encontrado que, en algunos casos, estos metabolitos secundarios presentan cierta toxicidad (Ongena M, *et al*, “*Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol”, Trends Microbiol 2008, vol. 16, pp.115-125).

5

Un segundo aspecto está relacionado con la bioseguridad, que tienen en cuenta las autoridades responsables de la aprobación de productos de consumo humano, incluyendo productos fitosanitarios (EPA en USA, EFSA en Europa), concretamente en relación con la posible patogenicidad oportunista o no oportunista de algunas especies bacterianas como *Pseudomonas fluorescens* y *Pantoea agglomerans*, que han sido citadas como causantes de infecciones y sepsis hospitalarias, consideración que puede ser un obstáculo en la autorización de cepas de estas especies para su uso como agente plaguicida. En la UE, las cepas *Pseudomonas fluorescens* A506, *Pantoea vagans* C9-1, *P. agglomerans* E325 y *P. agglomerans* P10c no han sido consideradas como QPS (“Qualified presumption of safety” en inglés, que significa presunción cualificada de seguridad, un término similar al conocido GRAS, “generally recognized as safe”, que significa generalmente reconocido como seguro), y por lo tanto no están autorizadas para el control biológico del fuego bacteriano.

En otros casos se tiene evidencia de que la capacidad para colonizar y sobrevivir en los órganos del huésped a proteger no es eficiente, lo que requiere aplicaciones a elevada concentración o formulaciones complejas de dichos agentes para conseguir un efecto significativo de control de la enfermedad.

Además, aunque se trata de productos biológicos que presentan ventajas sobre otros productos plaguicidas de síntesis, el hecho de tratarse de organismos vivos implica que las condiciones ambientales y del huésped influyen en su actividad biológica, lo que hace que su eficacia sea en general variable y significativamente inferior a la de los antibióticos de referencia.

Finalmente, la preparación industrial de formulados implica el procesamiento de los cultivos obtenidos por fermentación, para obtener productos deshidratados de larga duración. Dichos procesos requieren etapas de secado que afectan significativamente a la viabilidad de los microorganismos, limitando el rendimiento del proceso, en especial en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas* y *Pantoea*, las cuales son más sensibles a los tratamientos térmicos y de deshidratación que las Gram positivas.

En vista de las limitaciones mencionadas, queda claro que es deseable proporcionar medios más eficientes para el control biológico del fuego bacteriano en árboles frutales y plantas ornamentales.

5

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han aislado una nueva cepa de bacteria del ácido láctico (BAL) que es muy eficiente en el control del fuego bacteriano y que supera las limitaciones anteriormente citadas. La bacteria de la invención es una cepa perteneciente a la especie *Lactobacillus plantarum* que ha sido aislada a partir de plantas procedentes de campos de cultivos y entornos naturales de clima mediterráneo.

10

Así, en un primer aspecto la invención se refiere a la cepa de *Lactobacillus plantarum* TC92 o mutantes de la misma.

15

La cepa *Lactobacillus plantarum* TC92 de la invención, aislada de plantas de tomate de la región de Girona (Cataluña) fue depositada por el solicitante (Universitat de Girona) de acuerdo con el Tratado de Budapest el 13.03.2013 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), situada en el Parc Científic Universitat de Valencia, Edificio 3 CUE. Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia), España. La cepa de *Lactobacillus plantarum* fue depositada con la referencia de identificación TC92 y recibió el número de acceso CECT 8297 después de que la Autoridad Internacional de Depósito declarara como viable dicha cepa.

25

La invención también se refiere a mutantes de las cepas *Lactobacillus plantarum* TC92. Se entiende por "mutantes" bacterias que se obtienen utilizando como producto de partida la cepa *L. plantarum* TC92 de la invención y que se caracterizan por mantener las propiedades de dicha cepa depositada, en cuanto a la capacidad antagonista frente a bacterias fitopatógenas, bioseguridad y aptitud ecológica en la colonización de las plantas. Un "mutante" *L. plantarum* TC92 se entiende también según la presente invención como una "variante" de *L. plantarum* TC92. El experto en la materia entenderá que usando la cepa de la invención como material de partida es posible obtener de forma rutinaria, por ejemplo mediante mutagénesis o mutación espontánea dirigida, mutantes que conserven las características y ventajas pertinentes descritas en la presente memoria. Los métodos para

35

obtener mutantes de una cepa bacteriana concreta son conocidos en la técnica. Un ejemplo puede encontrarse en (Sambrook, J. y Russell, D.W. "Molecular cloning: a laboratory Manual", Capítulo 13, "Mutagenesis", Cold Spring Harbor, 3ª Ed., 2001). Las propiedades fundamentales que deben poseer los mutantes de las cepas de la invención son:

5

- (i) actividad antagonista frente a *Erwinia amylovora*,
- (ii) presencia de los genes *pln A*, *pln B*, *pln C*, *pln D*, *plnJ*, *plnK*, *plnM*, *plnN*, *plnO*, *plnP*, *plnEF* y *plnI* relacionados con la síntesis de plantaricinas,
- (iii) capacidad de colonizar o sobrevivir en la flor, hojas y frutos de las plantas pertenecientes a la familia Rosaceae, y
- (iv) capacidad de inhibir infecciones por *E. amylovora* en flores, frutos y hojas de plantas de la familia Rosaceae.

10

Preferentemente los mutantes tienen actividad antagonista frente al menos otra bacteria fitopatógena como *Pseudomonas syringae*, y de otras bacterias tipo como *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

15

La presencia de los genes relacionados con la síntesis de plantaricinas puede determinarse mediante parejas de cebadores definidos por las secuencias SEC ID NO: 3-26 tal y como se describe en el Ejemplo 1. La actividad antagonista puede determinarse según se describe en el Ejemplo 2. La capacidad de colonizar y sobrevivir en plantas de la familia Rosaceae puede determinarse según se describe en el Ejemplo 3. La capacidad para inhibir infecciones de *E. amylovora* puede determinarse según se describe en los Ejemplos 4 y 5.

20

En la presente invención el término "cepa de la invención" se refiere no sólo a la cepa *L. plantarum* TC92, sino también a mutantes de la misma.

25

La cepa de la invención posee varias ventajas que la hacen especialmente adecuada para su uso en el control integrado de plagas. En la presente invención el término "control integrado de plagas" (o "manejo integrado de plagas") tiene el significado habitual en el campo de la agronomía, donde se entiende como una estrategia que usa una gran variedad de métodos complementarios: físicos, mecánicos, químicos, biológicos, genéticos, legales y culturales para el control de plagas. Estos métodos se aplican en tres etapas: prevención, observación y aplicación. Es un método ecológico que aspira a reducir o eliminar el uso de plaguicidas de síntesis química y a minimizar el impacto en el medio ambiente. Se habla

30

35

también de control ecológico o biológico de plagas. Así, en la presente invención los términos “control de plagas”, “control biológico de plagas” se usan indistintamente y se refieren al control integrado de plagas.

- 5 Para empezar, las BALs en general, y la especie *Lactobacillus plantarum* en particular, son seguras y adecuadas para su uso en consumo humano. En consecuencia, la cepa de la invención es adecuada para su uso en agricultura. Las BALs están consideradas como GRAS por la FDA en Estados Unidos y como QPS por la EFSA en la Unión Europea.
- 10 Además de su reconocida bioseguridad, la cepa de la invención es altamente efectiva en la prevención del fuego bacteriano causado por la bacteria *E. amylovora* en las plantas de la familia Rosaceae. Por lo tanto esta cepa es útil para el control biológico de esta plaga y puede usarse como agente plaguicida. Tal y como se muestra en los Ejemplos más abajo, la efectividad de la cepa de la invención para el control del fuego bacteriano se debe
- 15 principalmente a su elevada actividad antagonista frente a *E. amylovora* y a su sorprendente aptitud ecológica para colonizar y sobrevivir en los órganos aéreos de la plantas como hojas, frutos y flores.

Por lo tanto, en otro aspecto la invención se refiere al uso de la cepa *Lactobacillus plantarum*

20 TC92 como plaguicida en plantas.

En la presente invención el término “plaguicida” se entiende con su acepción habitual en el campo de la agronomía como un producto destinado a matar, repeler, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos considerados plagas. Queda claro que, debido a la naturaleza

25 de la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92, en la presente invención se entiende que “plaguicida” es un plaguicida biológico o ecológico, también denominado bioplaguicida. En el ámbito de la presente invención el término “plaguicida” tendría el mismo significado que el término “fitosanitario”.

30 En una realización particular de la invención la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92 se usa para el control del fuego bacteriano en plantas de la familia Rosaceae. En otra realización particular, la cepa de la invención se usa en el control del fuego bacteriano en plantas frutales y ornamentales, preferentemente perales, manzanos, membrilleros, nísperos, espinos de fuego, serbales, mostajos, acerolos, guillomos, espinos albar y durillos.

35

La elevada actividad antagonista de la cepa de la invención es en parte consecuencia de la producción de compuestos peptídicos y no peptídicos que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas, entre las que se encuentra *E. amylovora*. Uno de estos compuestos es una plantaricina muy activa codificada por el gen *plnEF*. Aunque muchas cepas de *L. plantarum* contienen el gen *plnEF*, no todas ellas muestran actividad antagonista frente a *E. amylovora*. En este sentido, en el Ejemplo 1 se muestra que muchas de las cepas de *L. plantarum plnEF+* (las cuales poseen el gen de síntesis de la plantaricina EF), no tienen actividad antagonista relevante frente a *E. amylovora* o contra otras bacterias. En cambio, en la FIG. 1 se puede observar que la cepa de *L. plantarum* TC92 de la invención exhibe un espectro de antagonismo destacado frente a *E. amylovora*, además de frente a otras bacterias. Dicho efecto antagonista sorprendente también queda reflejado en los Ejemplos 5 y 6, en donde se demuestra la efectividad de las cepas *in vivo* para inhibir infecciones de *E. amylovora* en plantas de la familia Rosaceae. En el Ejemplo 1 también queda demostrado que la cepa de la invención tiene la capacidad de producir otro tipo de plantaricinas además de la que codifica el gen *plnEF*, como las codificadas por los genes *plnJ*, *plnK*, *plnM*, *plnN*, *plnO*, *plnP*, y *plnI*.

Por otro lado, tal y como se demuestra en el Ejemplo 3, la cepa de la invención tiene una elevada capacidad para colonizar y sobrevivir en órganos de las plantas a proteger contra el fuego bacteriano. Esta sorprendente aptitud ecológica es muy importante para el control biológico de la plaga.

De cara a su uso como plaguicida en plantas es importante obtener grandes cantidades de células viables de la cepa de la invención, para lo que es ventajoso disponer de un método escalable a nivel industrial que proporcione concentrados de células viables de fácil manejo y que conserven su viabilidad durante los periodos de almacenaje.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de células de la cepa de la invención que comprende: (i) inocular la cepa de la invención en un medio de cultivo apropiado, (ii) someter el medio de cultivo inoculado de la etapa (i) a condiciones propicias para el crecimiento de la cepa de la invención hasta alcanzar una concentración celular superior a 1×10^9 UFC/ml, (iii) separar las células del medio de cultivo, y (iv) recoger las células derivadas de la etapa (iii). Este procedimiento es adecuado para la obtención de la cepa de la invención con buena viabilidad y manteniendo las propiedades ventajosas para su uso como plaguicida en plantas.

La cepa de la invención puede inocularse en el medio a una concentración final entre el 1 y el 5%. Preferentemente el cultivo a inocular se encuentra en fase de crecimiento exponencial. Medios de cultivo adecuados para el crecimiento de la cepa de la invención son medios sintéticos, como MRS (de Man, Rogosa y Sharpe), SL (lactobacillus selectivo) y APT (all purpose medium), medios de origen vegetal como melazas (por ejemplo de caña de azúcar, remolacha) o medios de origen animal como subproductos lácteos (suero). Condiciones adecuadas para el crecimiento de la cepa son temperaturas entre 25 y 35 °C, pH entre 5 y 7, y concentración de oxígeno entre 15 e 30%. El crecimiento de la cepa de la invención se produce preferentemente bajo agitación. El crecimiento de celular se frenará al alcanzar, preferentemente, una concentración celular entre 3×10^9 y 8×10^9 UFC/ml, más preferentemente entre 4×10^9 y 6×10^9 . Un ejemplo del procedimiento detallado de obtención de células de la cepa de la invención está reflejado en el Ejemplo 7.

En una realización particular, el procedimiento para la obtención de células de la cepa de la invención comprende llevar a cabo una etapa (v), después de la etapa (iv), donde las células se someten a condiciones de deshidratación. La deshidratación se puede llevar a cabo mediante un proceso de liofilización. Alternativamente se puede deshidratar el material concentrado por secado mediante lecho fluidizado. Otra opción es deshidratar el material concentrado mediante atomización. En este sentido otra característica ventajosa de la cepa de la invención es que exhibe una elevada resistencia a los procesos de deshidratación que son habituales en la obtención de microorganismos a escala industrial. Con el fin de mejorar la viabilidad de las células antes de llevar a cabo el proceso de deshidratación se puede añadir al concentrado de células un ingrediente osmoprotector inerte.

En otra realización particular, el procedimiento para la obtención de células de la cepa de la invención comprende resuspender las células obtenidas en la etapa (iv) en un tampón adecuado para dar lugar a una suspensión concentrada de células.

Con vistas a su uso en el control de plagas, los agentes plaguicidas suelen ser formulados en composiciones que incluyen también aditivos adecuados para el uso agrícola para el cual están diseñados. Así, aspectos adicionales de la invención se refieren a composiciones plaguicidas que comprenden la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92 o mutantes de la misma junto con compuestos aceptables a nivel agrícola y al uso de estas composiciones en el control del fuego bacteriano en plantas de la familia Rosaceae. Las composiciones de la

invención pueden ser sólidas (incluyendo, por ejemplo, concentrado de bacterias deshidratadas) o líquidas (incluyendo suspensiones concentradas de bacterias).

5 “Compuestos adecuados para el uso agrícola” se refiere a aquellos compuestos y/o materiales que son adecuados para su uso en agricultura. En general dichos compuestos deben ser no tóxicos para el ser humano y preferentemente deben ser respetuosos con el medio ambiente.

10 En una realización particular, las composiciones plaguicidas de la invención pueden contener compuestos para mejorar la adherencia de las cepas en las plantas a tratar, compuestos fitofortificantes, nutrientes, humectantes, estabilizantes, osmoprotectores, antioxidantes, protectores solares, compuestos tamponadores o combinaciones de los mismos. Algunos compuestos para mejorar la adherencia son gelatinas, almidones, pectinas, alginatos y diversos tipos de gomas como xantanos. Muchos de estos compuestos
15 son también humectantes. Entre los protectores solares se incluyen colorantes como rojo Congo. Los fitofortificantes son compuestos que pueden favorecer que los cultivos desarrollen vigor o tolerancia frente a patógenos o a condiciones ambientales adversas como, por ejemplo, análogos del ácido jasmónico y ciertos estimuladores de defensas en las plantas como harpinas, quitosanos, y laminarinas. En particular las composiciones
20 plaguicidas de la invención contienen al menos un osmoprotector como aditivo. Ejemplos de compuestos osmoprotectores son betaínas, aminoácidos y trealosa.

Estrategias dirigidas a la mejora fisiológica de la cepa de la invención también pueden emplearse para incrementar la viabilidad de las células de la cepa de la invención en la
25 composición plaguicida y posterior efectividad en el control de la plaga. Estrategias de este tipo han sido descritas para otras bacterias bioplaguicidas (Cabrefiga *et al*, “Improvement of fitness and efficacy of a fire blight biocontrol agent via nutritional enhancement combined with osmoadaptation”. Applied and Environmental Microbiology, 2011, vol. 77, pp. 3174-3181)

30 Las composiciones de la invención también pueden contener un agente plaguicida adicional. En una realización, la composición de la invención comprende al menos un plaguicida adicional. Dichos agentes plaguicidas adicionales pueden ser agentes plaguicidas no biológicos, por ejemplo, antibióticos o derivados del cobre. La ventaja de las composiciones
35 que contienen plaguicidas biológicos como la cepa de la invención en combinación con

- plaguicidas tradicionales es que se reduce la cantidad de antibiótico o compuesto derivado del cobre que entra en contacto con el medio, reduciendo la contaminación. Además, los plaguicidas biológicos y los tradicionales pueden actuar de forma complementaria incrementando la efectividad de la composición para el control de la plaga. En las composiciones que comprenden antibióticos y/o compuestos de cobre resulta ventajoso utilizar un mutante de *Lactobacillus plantarum* TC92 resistente a dichos compuestos. Los antibióticos pueden seleccionarse del grupo que consiste en estreptomicina, tetraciclina y kasugamicina.
- 5
- 10 En una realización particular, el agente plaguicida adicional es otra cepa bacteriana con efectividad en el control del fuego bacteriano. Entre las cepas bacterianas con efectividad en el control del fuego bacteriano destacan, además de la cepa de la invención, la cepa *Lactobacillus plantarum* TC54, o mutantes de la misma, y la cepa *Lactobacillus plantarum* PM411, o mutantes de la misma. Preferentemente la composición de la invención comprende *Lactobacillus plantarum* TC92, *Lactobacillus plantarum* TC54 y *Lactobacillus plantarum* PM411 junto con aditivos adecuados para el uso agrícola.
- 15

Al igual que la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92, los inventores han encontrado que las cepas *Lactobacillus plantarum* TC54 y *Lactobacillus plantarum* PM411, así como mutantes de las mismas, tienen propiedades ventajosas para su uso como plaguicidas en el control biológico del fuego bacteriano. Estas cepas son seguras, poseen una elevada actividad antagonista frente a *E. amylovora* y son capaces de colonizar y sobrevivir en las plantas de la familia Rosaceae. Así, la presente invención también se refiere a una cepa de *Lactobacillus plantarum* TC54, mutantes de la misma, y a una cepa *Lactobacillus plantarum* PM411, mutantes de la misma. Otros aspectos se refieren al uso de cada una de estas cepas como plaguicidas en plantas, particularmente en el control del fuego bacteriano en plantas de la familia Rosaceae. Otros aspectos se refieren a composiciones plaguicidas que comprenden al menos una de estas cepas junto con compuestos aceptables a nivel agrícola y el uso de estas composiciones en el control del fuego bacteriano. La invención también se refiere a un procedimiento de obtención de células de *Lactobacillus plantarum* TC54 y/o *Lactobacillus plantarum* PM411 análogo al descrito para *Lactobacillus plantarum* TC92. La invención también contempla mutantes derivados de las cepas TC54 y PM411. Dichos mutantes deben poseer las propiedades arriba mencionadas para los mutantes de la cepa TC92.

20

25

30

35

Las cepas *Lactobacillus plantarum* TC54 y *Lactobacillus plantarum* PM411, aisladas de plantas de tomate y de peral, respectivamente, procedentes de la región de Girona (Cataluña), fueron depositadas por el solicitante (Universitat de Girona) de acuerdo con el Tratado de Budapest el 13.03.2013 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), situada en el Parc Científic Universitat de Valencia, Edificio 3 CUE. Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia), España. La cepa de *Lactobacillus plantarum* TC54 recibió el número de acceso CECT 8298. La cepa de *Lactobacillus plantarum* PM411 recibió el número de acceso CECT 8299. La Autoridad Internacional de Depósito declaró como viables dichas cepas.

10

La invención en otro aspecto se refiere a un extracto de la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92 o de un mutante de la misma obtenible mediante el procedimiento que comprende: (i) inocular la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92 o un mutante de la misma en un medio de cultivo apropiado, (ii) someter el medio de cultivo inoculado con la etapa (i) a condiciones propicias para el crecimiento de la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92 o un mutante de la misma hasta alcanzar una concentración celular superior a 1×10^9 UFC/ml, (iii) separar las células del medio de cultivo de la etapa (ii), (iv) recoger extracto libre de células, y (v) someter el extracto de la etapa (iv) a un proceso de concentración.

15

Medios de cultivo, condiciones de inoculación y condiciones de crecimiento adecuados para la cepa de la invención para la obtención del extracto son los mismos que los descritos más arriba para el procedimiento de obtención de células de esta bacteria. Preferentemente, el crecimiento de las células se frenará en fase estacionaria, más preferentemente después de 18-30 horas. En cuanto a la etapa (v), ejemplos no limitantes de procesos de concentración adecuados son deshidratación (liofilización, atomización), filtración, ultrafiltración, precipitación, centrifugación, y cromatografía.

20

Los extractos de *Lactobacillus plantarum* TC92 o de una cepa mutante de la misma, obtenidos según el procedimiento proporcionado por la presente invención presentan una elevada actividad antagonista frente a *E. amylovora*. Adicionalmente, con el fin de incrementar su actividad, el extracto de la invención se puede someter a un proceso de fraccionamiento para separar las fracciones más activas. Preferentemente, el fraccionamiento comprende un tratamiento con ácido tricloro acético y/o cromatografía de intercambio catiónico en fase reversa.

30

35

Los extractos de la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92 o un mutante de la misma pueden usarse directamente en el control biológico del fuego bacteriano aunque, preferentemente, formarán parte de una composición plaguicida junto con otros compuestos aceptables a nivel agrícola. Por lo tanto, aspectos adicionales de la invención proporcionan una
5 composición plaguicida que comprende el extracto de la invención y compuestos aceptables a nivel agrícola, así como el uso de dichas composiciones para el control del fuego bacteriano.

Los extractos de *Lactobacillus plantarum* TC54 y/o sus mutantes, de *Lactobacillus plantarum*
10 PM411 y/o sus mutantes, o de composiciones que los comprenden también son útiles para el control del fuego bacteriano. Dichos extractos se obtienen de manera análoga a la descrita para la obtención del extracto de la cepa TC92.

Por último la invención se refiere a un método de control biológico del fuego bacteriano en
15 plantas de la familia Rosaceae que comprende el tratamiento de las plantas con la cepa de la invención o una composición que comprende dicha cepa y/o el extracto de la cepa de la invención definido más arriba o una composición que comprende dicho extracto.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no
20 pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Además, la palabra "comprende" incluye el caso "consiste en". Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente
25 invención. Los signos numéricos relativos a los dibujos y colocados entre paréntesis en una reivindicación, son solamente para intentar aumentar la comprensión de la reivindicación, y no deben ser interpretados como limitantes del alcance de la protección de la reivindicación. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1. Dendrograma correspondiente al coeficiente de disimilaridad de 62 cepas de
35 *L. plantarum* positivas para los genes *plnEF*, según su perfil de antagonismo *in vitro* en agar LBP y MRS, frente a *Erwinia amylovora* (Ea), *Escherichia coli* (Ec), *Pseudomonas syringae*

(Ps), *Staphylococcus aureus* (Sa) y *Bacillus subtilis* (Bs). Los símbolos de actividad inhibitoria para cada bacteria indicadora significan: ++, halos de inhibición superiores a 10 mm en ambos medios de cultivo; +, halos de inhibición inferiores a 10 mm en ambos medios de cultivo; d, halos de inhibición sólo en un medio de cultivo; -, no se observan halos de inhibición. Se indican las tres agrupaciones principales al nivel de disimilaridad de 0,70 (G1, G2, G3), así como la posición de las cepas TC92, TC54 y PM411 en el dendrograma (flechas).

FIG. 2. Dendrograma correspondiente al coeficiente de disimilaridad de 41 cepas de *L. plantarum* que presentan actividad inhibitoria frente a *Erwinia amylovora*, clasificadas según el nivel de inhibición del sobrenadante del cultivo (S) y según la capacidad de protección frente a infecciones de fuego bacteriano en flores (FI), frutos (Fr) y hojas (H) de peral. En este último caso se realizaron dos experimentos. Los símbolos indican en el caso de la actividad inhibitoria de los sobrenadantes de cultivos (S): +++, intensa, ++, moderada, +, ligera. Los símbolos indican en el caso de la protección frente a infecciones: ++, en ambos experimentos efectos significativos; +, efectos significativos en un experimento; -, sin efecto en ninguno de los experimentos. La flecha indica la posición de las cepas TC54, TC92 y PM411.

FIG. 3. Cinética de crecimiento (círculos sólidos) de *Lactobacillus plantarum* TC92 y PM411 en caldo MRS a 25 °C y evolución del pH (círculos vacíos) y de la actividad antimicrobiana de sobrenadantes frente a *Erwinia amylovora* (triángulos). X, tiempo (horas). Y, concentración de viables (Log₁₀ UFC/ml). Z, actividad inhibitoria (unidades arbitrarias).

FIG. 4. Multiplicación y supervivencia de las cepas de *Lactobacillus plantarum* TC54 (círculos sólidos), TC92 (círculos vacíos) y PM411 (triángulos) en flores de peral y manzano, bajo condiciones de humedad relativa (HR) elevada (90%) y baja (50%). A, peral, HR alta; B, manzano, HR alta; C, peral, HR baja; D, manzano, HR baja. X, días tras la inoculación. Y, nivel poblacional (Log₁₀ UFC/flor). Los valores son las medias de tres réplicas y las barras de error representan el 95% del intervalo de confianza de la media.

FIG. 5. Efecto de los tratamientos con las cepas de *Lactobacillus plantarum* TC54, TC92 y PM411 en la susceptibilidad a infecciones por *Erwinia amylovora* en flores (A) frutos inmaduros (B) y hojas (C) de peral *Passe Crassane*. La intensidad de las infecciones se compara con un control no tratado (NT) y con un control tratado con el antibiótico de

referencia estreptomicina (Str). Los valores son las medias de tres réplicas y las barras de error representan el 95% del intervalo de confianza de la media. Letras iguales sobre las barras indican que los tratamientos no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Y, intensidad de las infecciones (%).

5

FIG. 6. Efecto de los tratamientos con las cepas de *Lactobacillus plantarum* TC54, TC92 y PM411 en la intensidad de las infecciones de fuego bacteriano en plantas de peral *Conference*. La intensidad de las infecciones se determinó a la semana de la inoculación de *Erwinia amylovora*. Se realizaron dos experimentos independientes (A, B). Los resultados se comparan con un control no tratado (NT) y con un control tratado con el antibiótico estreptomicina (Str). Los valores son las medias de tres réplicas y las barras de error representan el 95% del intervalo de confianza de la media. Letras iguales sobre las barras indican que los tratamientos no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Y, intensidad de las infecciones (%).

15

FIGURA 7. Efecto de los tratamientos con células de *Lactobacillus plantarum* TC92C y PM411C y con extractos de cultivos diluidos 1/10 (TC92S y PM411S), en la susceptibilidad a infecciones por *Erwinia amylovora* en hojas de peral *Conference*. La intensidad de las infecciones se compara con un control no tratado. Los valores son las medias de tres réplicas de 3 hojas y las barras de error representan el 95% del intervalo de confianza de la media. Letras iguales sobre las barras correspondientes a cada uno de los días evaluados indican que los tratamientos no difieren significativamente según la prueba de Waller ($P < 0,05$). Y, intensidad de las infecciones (%). Barras grises corresponden a los niveles de infección a los 6 días, y barras negras a los 9 días.

25

FIGURA 8. Patrón de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) para diferentes cebadores: P3, P4, P7, M13, Inv-A, 512Fb y XD9. M, escalera 1 Kb Plus (Invitrogen); 1, *L. plantarum* TC54; 2, *L. plantarum* TC92; 3, *L. plantarum* PM411; 4, *L. plantarum* CECT 223; 5, *L. plantarum* ATCC 8014; 6, *L. plantarum* CECT 4528; 7, *L. plantarum* CECT 5785; 8, *L. plantarum* LNG9211 (WCSF1).

30

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Aislamiento y caracterización de las cepas *Lactobacillus plantarum* TC92, *Lactobacillus plantarum* TC54 y *Lactobacillus plantarum* PM411

35

Para obtener los aislados se tomaron muestras de hojas, flores y frutos obtenidos a partir de plantaciones comerciales de frutales de pepita y hueso, así como de productos hortícolas obtenidos en mercados y de productos de cuarta gama (ensaladas, germinados, etc.), todos ellos procedentes de campos de cultivo y entornos naturales de clima mediterráneo. Las muestras se procesaron según métodos microbiológicos convencionales (Mora *et al*, “Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments”, International Microbiology, 2011, vol. 14, pp. 213-223), y se aislaron bacterias del ácido láctico (BALs) en medio MRS a 23 °C durante 48 h, constituyendo una colección de 600 aislados. Dichos aislados se sometieron a un estudio para determinar la presencia del gen *plnEF* responsable de la producción de un tipo de plantaricinas (Sáenz Y *et al*, “Genetic diversity of the *pln* locus among oenological *Lactobacillus plantarum* strains”, Int. J. Food Microbiol. 2009, vol. 134, pp. 176–183). El DNA de los aislados y de las cepas de referencia *L. plantarum* LMG 9211 (control positivo) y *Leuconostoc mesenteroides* CM160 (control negativo) se utilizó para detectar dicho gen mediante PCR. El DNA se obtuvo a partir de cultivos en fase exponencial mediante extracción en tampón Tris-salino-EDTA-SDS antioxidante y precipitación con isopropanol, ajustando la concentración a 10 ng/μL. Las reacciones de amplificación se realizaron en condiciones estándar utilizando los cebadores definidos por las secuencias SEC ID NO: 25 (*plnEF* f) y SEC ID NO: 26 (*plnEF* r). Las condiciones fueron de 4 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 53 °C, y 1 min a 72 °C, con una etapa de extensión final de 10 min at 72 °C seguida de una parada a 4 °C. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en 1X Tris-acetato EDTA (TAE) durante 45 min a 90 V y visualizados con Sybr Safe (SYBR®Safe Invitrogen Life Technologies, CA). Entre los aislados sólo el 10.5% de las cepas (63 de 600 aislados) presentan el marcador génico *plnEF* (FIG. 1), lo que demuestra una presencia de dichos genes baja en la población de BALs aisladas de plantas.

Para determinar la especie de BAL a la que pertenecían los 63 aislados que poseían los genes *pln EF*, se procedió a secuenciar parcialmente el gen 16S rDNA (regiones V1 a V3). Para ello se procedió a realizar una PCR sobre el DNA extraído de los cultivos con los cebadores 27f (SEC ID NO: 1) y 1492r (SEC ID NO: 2) en condiciones estándar (Lane, D.J., “Nucleic acid techniques in bacterial systematics”, Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, 1991, pp. 115-175). Los productos de PCR fueron purificados, concentrados convenientemente y secuenciados mediante un secuenciador 3730XL (Macrogen, Seoul, Korea). Las secuencias obtenidas fueron

analizadas y alineadas mediante BioEdit Sequencing Editor, y la homología determinada mediante el programa BLAST en la base de datos NCBI database. Las secuencias de las cepas más representativas se depositaron en el GenBank (cepa *Lactobacillus plantarum* TC92, No JX440375 16S; cepa *Lactobacillus plantarum* TC54, No. EU074830.1; y cepa
 5 *Lactobacillus plantarum* PM411, No. JX440377 16S).

Los 62 aislados de *L. plantarum* que poseían los genes *plnEF* fueron sometidos a pruebas de actividad antimicrobiana *in vitro* contra seis bacterias indicadoras (*E. amylovora* PMV6076, *P. syringae* EPS94, *L. mesenteroides* CM160, *E. coli* ATCC5954, *S. aureus*
 10 ATCC9144 y *B. subtilis* EPS2017), utilizando la técnica del repicado de colonias en sobrecapa de agar lactosa-púrpura de bromocresol (LBP) y MRS modificado (MRS0.2). Los halos de inhibición del crecimiento en los indicadores se determinaron al cabo de 48 h a 23 °C. Los resultados de diámetro de inhibición se normalizaron y se utilizaron para realizar un análisis jerárquico de agregación utilizando el coeficiente de Jaccard de disimilaridad con el
 15 algoritmo UPGMA (NTSYS, Exeter, USA). Se observan 3 agregados diferentes en función del patrón de actividad antibacteriana a un nivel de similaridad de 0,7, siendo el grupo G2 el más activo (FIG. 1). Los restantes otros dos grupos presentaron una actividad baja o sólo frente a una o dos bacterias indicadoras. Aunque se podría esperar que todas las cepas de *L. plantarum plnEF+* (que poseen el gen de síntesis de plantaricina EF) presentaran
 20 actividad antagonista frente a *E. amylovora* o contra las otras bacterias fitopatógenas, esto no es así ya que 19 cepas no son activas o sólo lo son ligeramente. Sólo en el grupo 2 la mayoría de cepas muestran amplio espectro de antagonismo, en especial las cepas TC54, PM411 y TC92. Esto puede deberse a que dicho gen no se exprese en algunas cepas o que las cepas activas presenten mecanismos adicionales que influyen en su capacidad
 25 antagonista frente a bacterias. Es bien conocido que las bacterias del ácido láctico productoras de bacteriocinas son muy efectivas contra bacterias de la misma especie y contra otras Gram positivas (como ellas mismas), pero escasamente contra bacterias Gram negativas. Sin embargo, algunas cepas *plnEF+* de la invención, contrariamente a lo esperado, presentan un mayor antagonismo contra *E. amylovora* y *P. syringae* (Gram
 30 negativas) que contra Gram positivas (*B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*). Sorprendentemente, ninguna de las cepas mostró actividad contra *L. mesenteroides* CM160.

Además, se realizó un estudio de los 41 aislados que mostraron actividad antagonista *in vitro* frente a *E. amylovora*, determinando su capacidad para inhibir infecciones de dicho
 35 patógeno en flores, frutos inmaduros y hojas que permitió diferenciar aún más entre los

aislados *plnEF+*. Se realizaron varios experimentos en flores, hojas y frutos de peral de la variedad *Passe Crassane*. Para ello se obtuvo el material vegetal a partir de una finca comercial en Girona. Para los ensayos con flores una vez en el laboratorio se dispusieron individualmente sumergiendo el pedúnculo en tubos conteniendo una solución de sacarosa 10%. Los frutos inmaduros y hojas se desinfectaron con una solución de hipoclorito diluida, se lavaron y se eliminó el exceso de agua. Los frutos se lesionaron con un sacabocados (3 heridas por fruto) mientras que a las hojas se les practicó una incisión transversal en el nervio central. Todo el material vegetal fue inoculado con los aislados que mostraron actividad antagonista in vitro frente a *E. amylovora*, incluyendo las cepas TC54, TC92 o PM411 a 10^8 CFU/mL (0.4-1 mL por flor, hoja o fruto) utilizando un micropulverizador. El material se incubó en contenedores de plástico transparente que se dispusieron en cámaras de ambiente controlado a 25 °C, humedad relativa (HR) elevada y 16 h luz-8 h oscuridad. Al cabo de 24 h se inocularon los hipantios de las flores y las heridas de los frutos u hojas con una suspensión de *E. amylovora* EPS101 a 10^7 CFU/mL. El material tratado se incubó en las condiciones anteriores durante 5 días y se determinó la incidencia y severidad de la enfermedad (infecciones). El análisis del dendrograma resultante según su capacidad antagonista y de inhibición de infecciones revela que existe una diversidad muy notable entre aislados (FIG. 2). Se confirma de forma sorprendente la naturaleza única de las cepas TC54, TC92 y PM411 que se agrupan en agregados en la parte inferior del dendrograma porque muestran una eficacia superior a las demás.

Con el fin de caracterizar con más detalle una de las cepas TC92, TC54 y PM411 se procedió a determinar la presencia de genes relacionados con la síntesis de plantaricinas, concretamente del operón regulador *plnABCD* (*pln A*, *pln B*, *pln C*, *pln D*) y de producción de diversas plantaricinas (*pln K*, *pln M*, *pln N*, *pln O*, *pln P*, *pln EF*, *pln I*), y se comparó con otras cepas de la colección y con cepas de referencia descritas por otros autores y depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Dicho estudio se realizó mediante cultivo de las cepas en medio MRS en las condiciones descritas anteriormente, extracción del DNA, y realización de una PCR mediante los cebadores específicos de los genes reguladores, de transporte y de síntesis de plantaricinas. A continuación se describen las secuencias de los cebadores y referencias bibliográficas para cada uno de ellos.

En el caso del gen *plnA* se utilizaron las condiciones y la pareja de cebadores definidos por la SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4 descritos por Macwana *et al* ("A 'bacteriocin PCR array' for identification of bacteriocin-related structural genes in lactic acid bacteria", Journal of

Microbiological Methods 2012, vol. 88, pp. 197–204). El resto de genes reguladores y de síntesis se determinó mediante las parejas de cebadores descritos por Sáenz *et al.*, (“Genetic diversity of the *pln* locus among oenological *Lactobacillus plantarum* Strains”, International Journal of Food Microbiology 2009, vol. 134, pp. 176–183) para los genes *plnB* (SEC ID NO: 5 y SEC ID NO: 6), *plnC* (SEC ID NO: 7 y SEC ID NO: 8), *plnD* (SEC ID NO: 9 y SEC ID NO: 10), *plnJ* (SEC ID NO: 11 y SEC ID NO: 12), *plnK* (SEC ID NO: 13 y SEC ID NO: 14), *plnM* (SEC ID NO: 15 y SEC ID NO: 16), *plnN* (SEC ID NO: 17 y SEC ID NO: 18), *plnO* (SEC ID NO: 19 y SEC ID NO: 20), *plnP* (SEC ID NO: 21 y SEC ID NO: 22), y *plnI* (SEC ID NO: 23 y SEC ID NO: 24). Para el gen de síntesis de plantaricina *plnEF* se utilizaron los cebadores (SEC ID NO: 25 y SEC ID NO: 26) descritos por Rojo-Bezales *et al.* (“Characterization of a new organization of the plantaricin locus in the inducible bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J23 of grape must origin”, Arch Microbiol 2008, vol. 189, pp. 491–499).

Como se puede apreciar en la siguiente tabla, las cepas TC92, TC54 y PM411 pueden diferenciarse por PCR de otras cepas mediante el tipado de dichos genes de síntesis de plantaricinas, dando un patrón específico positivo para todos ellos. Además dicho estudio confirma que las cepas de la invención poseen el potencial de producción de otros tipos distintos de bacteriocinas, además de la codificada por el gen *plnEF*, como por ejemplo las codificadas por los genes *plnJ*, *plnK*, *plnM*, *plnN*, *plnO*, *plnP*, y *plnI*.

Tabla 1A y 1B. Características de las cepas de *Lactobacillus plantarum* TC92, PM411 y TC54 en cuanto a la presencia de genes que intervienen en la síntesis de plantaricinas, en comparación con otras cepas de diversos orígenes y cepas de referencia depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). +, presencia; -, ausencia; s, amplificación por PCR de menor intensidad que el control positivo; nd, no determinado.

Cepa	Origen	Operón regulador			
		<i>plnA</i>	<i>plnB</i>	<i>plnC</i>	<i>plnD</i>
TC92	tomate	+	+	+	+
TC54	tomate	+	+	+	+
PM411	pera	+	+	+	+
CECT223	desconocido	s	-	s	-
ATCC8014	maíz ensilado	s	-	-	+
CECT4528	leche	s	-	s	-
CECT5785	queso	+	+	+	+
EC65	maíz fermentado	+	+	-	-
J51	vino	+	+	+	+

Tabla 1A

Cepa	Origen	Operón regulador			
		<i>plnA</i>	<i>plnB</i>	<i>plnC</i>	<i>plnD</i>
NC8	ensilado	-	-	-	+

Tabla 1B

Cepa	Origen	Operones de síntesis de plantaricinas							
		<i>plnJKLR</i>		<i>plnMNOP</i>				<i>plnEFI</i>	
		<i>plnJ</i>	<i>plnK</i>	<i>plnM</i>	<i>plnN</i>	<i>plnO</i>	<i>plnP</i>	<i>plnEF</i>	<i>plnI</i>
TC92	tomate	+	+	+	+	+	+	+	+
TC54	tomate	+	+	+	+	+	+	+	+
PM411	pera	+	+	+	+	+	+	+	+
CECT223	desconocido	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC8014	maíz ensilado	-	-	-	-	-	-	+	+
CECT4528	leche	-	-	-	-	-	+	s	+
CECT5785	queso	-	-	-	-	-	-	+	+
EC65	maíz	-	+	nd	+	nd	nd	+	+
J51	vino	-	-	-	-	-	-	+	+
NC8	ensilado	+	+	-	-	-	+	+	+

Con el fin de diferenciar las cepas TC92, TC54 y PM411 de otras cepas de *L. plantarum* depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) se procedió a la

5 amplificación aleatoria de ADN polimórfico, técnica conocida por el acrónimo inglés RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNA), que utiliza cebadores cortos arbitrarios (8-12 nucleótidos) que generan tras la PCR con un solo cebador, amplificaciones que permiten realizar tipado de cepas (Williams J G *et al*, "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers". *Nucleic Acids Res.*, 1190, vol. 18, pp. 6531-6535).

10 Dicho estudio se realizó mediante cultivo de las cepas en medio MRS en las condiciones descritas anteriormente, extracción del DNA, y realización de PCRs mediante cebadores específicos conocidos en el estado de la técnica. Los siguientes cebadores fueron utilizados: SEC ID NO: 27 (P3, Tailliez P, *et al*, "Molecular diversity and relationships with *Lactococcus lactis* as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)". *System. Appl. Microbiol.*,

15 1998, vol. 21, pp. 530-538), SEC ID NO: 28 (P4), SEC ID NO: 29 (P7) y SEC ID NO: 30 (M13)(Di Cagnio R, *et al*. "Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, french beans or marrows.", *Int. J. Food Microbiol*, 2008, vol. 127, pp. 220-228), SEC ID NO: 31 (Inv-A, Rahn K, *et al*. "Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polimerase chain reaction as a specific method of detection of

20 *Salmonella*", *Mol. Cell. Probes*, 1992, 6: 271-279), SEC ID NO: 32 (512Fb, Holt S M y Cote G L. "Differentiation of dextran-producing *Leuconostoc* strains by a modified randomly amplified polymorphic DNA protocol", *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, vol. 64, pp.

3096-3098), y SEC ID NO: 33 (XD9, Moschetti G J, *et al.* "Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains", Appl. Microbiol., 1998, vol. 85, pp. 25-36). El mix de PCR consistió en un volumen total de 50 µl conteniendo 1x de tampón, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cebador y 3,75 U de taq polimerasa (Invitrogen) y 4 µl de DNA (25 ng/µl). Las condiciones para la amplificación fueron para el cebador SEC ID NO: 30 M13 de (i) desnaturalización a 94°C durante 3 min, (ii) 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, 40°C durante 20 s, con una rampa hasta 72°C a 0.6 °C/s i (iii) una extensión final a 72°C durante 2 min. Para los cebadores SEC ID NO: 27 P3 y SEC ID NO: 28 P4 las condiciones fueron de (i) desnaturalización a 94°C durante 3 min, (ii) 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, 36°C durante 2 min y una extensión a 72°C durante 2 min. Para los cebadores SEC ID NO: 29 (P7), SEC ID NO: 31 (Inv-A), SEC ID NO: 32 (512Fb) y SEC ID NO: 33 (XD9), las condiciones fueron (i) desnaturalización a 94°C durante 4 min, (ii) 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, 35°C durante 1 min, extensión a 72°C durante 2 min (iii) una extensión final a 72°C durante 5 min. En la FIG 8 se puede apreciar que las cepas TC92, TC54 y PM411 se pueden diferenciar de otras cepas de *L. plantarum* depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) como CECT223, ATCC8014, CECT4528, CECT5785 y LMG9211, ya que su patrón de bandas RAPDs es diferente con los cebadores P3, P4, P7, M13, Inv-A, 512Fb y XD9. Dichos patrones son reproducibles en las mismas condiciones experimentales para todas las cepas.

Las cepas TC92 y TC54, si bien no son diferenciables en función de su patrón de RAPDs, sí pueden diferenciarse en función de su actividad antagonista frente a diferentes patógenos (ver FIG 1) y, en concreto, por su actividad inhibitoria frente a *Erwinia amylovora* (FIG 2). Como se puede apreciar en los ejemplos que siguen, dichas cepas también mostraron diferencias en cuanto a su capacidad para colonizar y sobrevivir en flores de manzano y peral (ver FIG 4) y su capacidad para inhibir infecciones por fuego bacteriano (ver FIG 5).

Ejemplo 2. Estudio de la actividad antagonista de los extractos de *L. plantarum* TC92, *L. plantarum* TC54 y *L. plantarum* PM411.

La singularidad de las cepas TC54, TC92 y PM411, pone de manifiesto el interés en determinar la naturaleza de su actividad antagonista e inhibitoria contra *E. amylovora*.

En primer lugar, se verificó que existía actividad antimicrobiana en el extracto resultante del crecimiento en "batch" de dichas cepas en caldo MRS (a 30 °C, pH 6,0, pO₂ 20%), y que

esta actividad variaba a lo largo del proceso. Para ello, alícuotas de los cultivos tomadas a distintos tiempos, filtrados para eliminar las células, fueron liofilizados y el material resultante resuspendido en tampón citrato. El extracto 15 veces concentrado fue ensayado mediante la técnica de la sobrecapa de agar, aplicando alícuotas de 10 µl contra *E. amylovora* inoculada en agar Mueller-Hinton. La actividad antimicrobiana se determinó en unidades arbitrarias (UA) como el inverso de la mayor dilución que mostraba actividad inhibitoria. Durante la realización de las curvas de crecimiento en cultivo en "batch", se determinó además de la concentración de células viables, el pH y la actividad antibacteriana del extracto tal y como se ha indicado. Se observa que los cultivos crecen exponencialmente hasta 20h después de la inoculación en medio fresco, entrando posteriormente en fase estacionaria, llegando a concentraciones celulares muy elevadas de 5×10^9 CFU/mL. La actividad inhibitoria de los extractos se inicia con la fase estacionaria y aumenta con la disminución del pH. Sin embargo, una vez éste se estabiliza en valores ácidos (pH de 3,6-4,0) hacia las 20 h, la actividad antibacteriana contra *E. amylovora* continúa aumentando hasta 60-80 h desde el inicio del cultivo. Estos resultados son indicativos de que además de compuestos de carácter ácido que pueden inhibir *E. amylovora*, las cepas producen otras sustancias antimicrobianas (FIG. 3).

La naturaleza de la actividad antibacteriana de los extractos de los cultivos también se determinó estudiando el efecto de: (1) neutralizar los extractos para ver si se trataba de ácidos inhibidores, (2) mediante tratamiento por calor para desnaturalizar posibles proteínas activas, y (3) con tratamiento por proteasas para confirmar su naturaleza peptídica. Para verificar el efecto del pH los extractos se ajustaron a valores de 2, 3, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 7 y 8. Para la inactivación térmica los filtrados concentrados se sometieron a 50, 70, 90 o 121 °C durante 30 min. Para la susceptibilidad a proteasas se realizó una digestión con proteinasa K. El ensayo de actividad inhibitoria se realizó con el sistema de micropocillos ELISA añadiendo los extractos crudos tratados a cultivos de *E. amylovora* en caldo LBP y mediante monitorización del crecimiento, tras incubación de las microplacas a 25 °C durante 72 h en agitación. La actividad inhibitoria se determinó mediante el área bajo las curvas de crecimiento y se calculó como proporción de inhibición respecto a los controles no tratados. Los extractos retuvieron completamente la actividad tras el tratamiento térmico a 120 °C durante 10 min y la actividad se mantuvo estable a pH entre 3-4, pero disminuyó progresivamente hasta pH 7.0, restaurándose de nuevo al ajustar a valores ácidos. La actividad inhibitoria se perdió completamente tras el tratamiento con proteinasa K y disminuyó drásticamente con quimotripsina. Estos resultados confirman que las cepas

TC54, TC92 y PM411 producen dos tipos de sustancias inhibitoras de *E. amylovora*: compuestos de naturaleza ácida y compuestos de naturaleza peptídica termoestables.

5 Se procedió también a una caracterización adicional de los extractos de los cultivos de las cepas TC54, TC92 y PM411 mediante fraccionamiento. Los extractos concentrados por liofilización fueron tratados con TCA-acetona-DTT (15% TCA, 20 mM DTT acetona fría) para precipitar péptidos y proteínas. El material resuspendido se aplicó a columnas de intercambio catiónico de fase reversa, recogiendo fracciones no retenidas, y eluyendo el material adsorbido mediante metanol, ácido acético 50% y ácido acético al 100%. Las
10 fracciones obtenidas se liofilizaron para concentrar y eliminar los ácidos orgánicos utilizados como eluyentes, y el sedimento resultante se disolvió en agua. Se ensayó la actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas mediante el método de difusión en agar, contra *E. amylovora* 6076 y *E. coli* ATCC11775. Se concluyó que una parte importante de la actividad contra ambas bacterias se debe a productos de naturaleza peptídica, un grupo de
15 éstos no son retenidos en la columna cromatográfica, mientras que otro queda retenido y es eluído con metanol.

Ejemplo 3. Colonización de órganos de las plantas por las cepas de *L. plantarum* para su protección contra el fuego bacteriano.

20 Se estudió la capacidad de las cepas TC92, TC54 y PM411 para colonizar y sobrevivir en flores de manzano y peral. Esta propiedad es muy importante para proteger las principales vías de entrada de infecciones por *E. amylovora* en las plantas.

25 Las cepas TC92, TC54 y PM411 fueron cultivadas en "batch" en caldo MRS a 30 °C, pH 6,0, pO₂ 20% hasta alcanzar una concentración de 5 x 10⁹ CFU/mL (aproximadamente durante 20 h). Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en solución Ringer 1/4, hasta conseguir una concentración de 1 x 10⁸ CFU/mL. Con el fin de disponer de un sistema para el análisis específico de las cepas durante el experimento de colonización y
30 evitar la interferencia de microbiota autóctona que pudiera quedar tras la desinfección, se obtuvieron mutantes espontáneos resistentes a rifampicina (cepas TC92R y TC54R) y ácido nalidíxico (PM411N), de modo que esta propiedad se utilizó como herramienta de contraselección en el recuento de viables en placa añadiendo los correspondientes antibióticos al agar. Se tomaron corimbos florales de árboles en una finca comercial de
35 Girona y una vez en el laboratorio se pulverizaron hasta punto de goteo con suspensiones

de las cepas a 10^8 CFU/mL. Las flores se dispusieron individualmente sumergiendo el pedúnculo en tubos conteniendo una solución de sacarosa 10%. EL material se dispuso en cámaras de ambiente controlado bajo humedad relativa elevada (90% RH) o baja (50% RH) a 25 °C. Para cada HR se emplearon 3 replicados de 30 flores. Un experimento se realizó con flores de peral *Passe Crassane* y otro con flores de manzano Golden. A continuación se tomaron muestras de 5 flores a diferentes tiempos (0, 24, 48, 120, 168, y 216 h). Las flores se homogeneizaron en tampón fosfato peptonado neutro mediante un agitador de palas. Los extractos se diluyeron adecuadamente y las diluciones se sembraron utilizando un sistema automático de siembra en espiral sobre placas de agar MRS suplementadas con los correspondientes antibióticos. Las placas se incubaron a 25°C durante 48 h y se contaron las colonias mediante un sistema de recuento automático. La dinámica poblacional de las tres cepas fue similar tanto en manzano como en peral. Se observaron diferencias significativas en los niveles poblacionales entre condiciones de humedad. Bajo HR elevada los niveles poblacionales aumentaron en las tres cepas 10 veces dos días tras su inoculación, manteniéndose niveles poblacionales cercanos a 10^8 UFC/flor durante 7 días (FIG. 4). En condiciones de HR baja, que son más adversas para el crecimiento bacteriano, los niveles poblacionales decrecieron progresivamente tan sólo 10 veces en 9 días. Estos resultados confirman la capacidad de las cepas para colonizar o sobrevivir en órganos de las plantas a proteger contra el fuego bacteriano, y en especial en las flores que son los órganos más susceptibles al fuego bacteriano.

Ejemplo 4. Capacidad inhibitoria de infecciones por fuego bacteriano en órganos de las plantas.

Para poner de manifiesto las capacidades de protección de las cepas TC92, TC54 y PM411 se realizó un ensayo de inhibición de infecciones en flores, frutos inmaduros y hojas de peral *Passe Crassane*.

Suspensiones de las cepas a 1×10^8 CFU/mL se obtuvieron de igual modo que en el Ejemplo 3. El material vegetal se obtuvo de una plantación comercial cerca de Girona, en donde no se había detectado fuego bacteriano en el pasado. Para los ensayos con flores, cada flor individual se dispuso con el pedúnculo sumergido en una solución de sacarosa al 10% en viales de plástico. Los frutos inmaduros de 6 semanas y las hojas jóvenes fueron desinfectados por inmersión en una solución diluída de hipoclorito sódico y posteriormente lavados para eliminar restos. En cada fruto se practicaron tres heridas con un sacabocados

(1 mm). En las hojas se practicó una incisión transversal en el nervio principal. Las flores y frutos inmaduros fueron pulverizados con suspensiones de las cepas TC92, TC54 y PM411 a 10^8 UFC /mL (0.4-1 ml por flor o fruto) mediante micropulverizador, mientras que las hojas se inocularon por inmersión en la suspensión. Tanto los viales conteniendo la flores como los frutos y hojas se incubaron en una cámara de ambiente controlado a 25 °C y control de la humedad relativa, con 16 h de luz fluorescente y 8 h de oscuridad. Al cabo de 24 h, se inocularon los hipantios de las flores, y las heridas de los frutos y hojas con 10 µl de una suspensión de *E. amylovora* EPS101 a 10^7 UFC /mL. El material inoculado se dispuso en cajas de plástico transparente y se incubaron durante 5 días en las condiciones descritas anteriormente. El diseño experimental consistió en 3 replicas por tratamiento con 3 frutos, 10 flores o 3 hojas por replica. Se incluyeron controles no tratados con *L. plantarum* o tratados con un antibiótico de referencia (estreptomina) a 100 mg/L y se realizaron dos experimentos independientes. Los niveles de infección en el caso de las flores se determinaron para cada flor de acuerdo con una escala de 0 a 3 en función de los síntomas observados: 0, no síntomas; 1, necrosis parcial del hipantio; 2, necrosis total del hipantio; 3, progresión de la necrosis a través del pedúnculo. Para los frutos cada herida se valoró según: 0, sin síntomas; 1, presencia de exudados en la herida; 2, presencia de exudados y necrosis alrededor de la herida; 3, necrosis que se extiende por la superficie del fruto. En las hojas la intensidad de las infecciones se determinó según: 0, sin síntomas; 1, presencia de exudado en la herida; 2, presencia de exudado y necrosis alrededor de la herida; y 3, progresión de la necrosis a través de la superficie foliar. La severidad se normalizó para el máximo valor obtenido en el experimento y se expresó en porcentaje relativo (0-100).

El efecto inhibitorio del fuego bacteriano en las 3 cepas (TC92, TC54 y PM411) fue significativo en comparación con los controles no tratados, y en general, no difirieron significativamente del antibiótico de referencia (FIG. 5). Las cepas TC92 y TC54 difirieron significativamente del control no tratado en todos los órganos estudiados, mientras que PM411 sólo fue efectiva en hojas y flores. Las eficacias medias se situaron entre 67 y 78% en hojas, y 45-75% en flores. En frutos inmaduros las cepas TC92 y TC54 redujeron infecciones en comparación con los controles no tratados con una eficacia media del 50%. Por lo tanto este experimento demostró la efectividad del tratamiento del fuego bacteriano con dichas cepas, en unas condiciones en que las infecciones por el patógeno están muy favorecidas.

Ejemplo 5. Tratamiento preventivo del fuego bacteriano en plantas de frutales mediante las cepas de *L. plantarum* TC92, TC54 y PM411.

5 Para demostrar la eficacia de las cepas de *L. plantarum* de la invención en el control del fuego bacteriano se realizaron ensayos con plantas de peral del cultivar Conference.

10 Las plantas fueron cultivadas en macetas de 20 cm de diámetro. Durante el invierno se sometieron a vernalización y durante primavera se podaron para dejar 3 a 4 brotes por planta y forzadas a brotación en el invernadero. Durante el desarrollo vegetativo las plantas fueron fertilizadas con una solución de 200 ppm N/P/K (20:10:20) y fueron utilizadas cuando los brotes tenían 3-4 cm de longitud con 5-6 hojas jóvenes por brote. Para su uso en los ensayos, se practicó una incisión doble en el nervio principal de las tres hojas expandidas en cada uno de los tres brotes. Posteriormente las plantas fueron pulverizadas con la correspondiente suspensión de la cepa de *L. plantarum* a 10^8 CFU/mL (obtenida de igual modo que en el Ejemplo 3) hasta el punto de goteo (10 mL por planta). El material tratado fue cubierto con bolsas de plástico y mantenido a 25 °C durante 24 h con un fotoperiodo de 16h luz-8 h oscuridad. Posteriormente, se procedió a inocular las heridas practicadas en las hojas con una suspensión de *E amylovora* EPS101 a 10^6 UFC/ml y el material introducido de nuevo en bolsas de plástico y mantenido a 25 °C en fotoperiodo. El diseño experimental consistió en tres repeticiones de dos plantas por tratamiento de cepa de *L. plantarum*. Se realizaron también controles no tratados y un control tratado con estreptomicina a 100 mg/L. Se realizaron dos experimentos independientes. La intensidad de las infecciones se determinó según la misma escala descrita en el apartado anterior para hojas. Las tres cepas de *L. plantarum* inhibieron significativamente las infecciones por fuego bacteriano en los dos ensayos realizados, en comparación con los controles no tratados. Los niveles de enfermedad fueron significativamente menores que en los controles no tratados para las cepas PM411 y TC92 en los dos experimentos (FIG. 6), aunque sólo en uno de ellos para la cepa TC54. Los niveles de eficacia fueron 50-68% para TC92, 35-65% para PM411, y 28-58% para TC54.

30

Ejemplo 6. Efecto de los extractos de *L. plantarum* TC92 y *L. plantarum* PM411 en la inhibición de infecciones por fuego bacteriano en hojas.

35 Para poner de manifiesto las capacidades de protección de los extractos de las cepas TC92, y PM411 se realizó un ensayo de inhibición de infecciones en hojas de peral Conference.

Para cada cepa se preparó un cultivo en “batch” como en el ejemplo 3. Las suspensiones de las células se obtuvieron a partir de una muestra tomada a las 20 h de cultivo y la concentración se ajustó a 1×10^8 CFU/mL como en el ejemplo 3. Los extractos de los cultivos se prepararon como se indica en el Ejemplo 2 a partir de una muestra del cultivo tomada a las 70 h en la que la actividad antibacteriana era máxima. El material vegetal se obtuvo de una plantación comercial cerca de Girona, en donde no se había detectado fuego bacteriano en el pasado. Las hojas jóvenes fueron desinfectadas con hipoclorito sódico, posteriormente se les practicó una incisión transversal en el nervio principal, y fueron inoculadas con suspensiones celulares de las cepas TC92 y PM411 a 10^8 UFC /ml por inmersión en la suspensión o con los extractos de las mismas cepas diluidos a 1/10. Las hojas se incubaron en una cámara de ambiente controlado a 25 °C y control de la humedad relativa, con 16 h de luz fluorescente y 8 h de oscuridad, y al cabo de 24 h, se inocularon con 10 µl de una suspensión de *E. amylovora* EPS101 a 10^7 UFC /mL. El material inoculado se incubó en las condiciones descritas anteriormente y se determinó la intensidad de las infecciones a los 6 y 9 días. El diseño experimental consistió en 3 replicas por tratamiento con 3 hojas por replica. La intensidad de las infecciones se determinó según: 0, sin síntomas; 1, presencia de exudado en la herida; 2, presencia de exudado y necrosis alrededor de la herida; y 3, progresión de la necrosis a través de la superficie foliar. La severidad se normalizó para el máximo valor obtenido en el experimento y se expresó en porcentaje relativo (0-100). Se observó que a los 6 días de la inoculación del patógeno tanto las células como los extractos de las dos cepas presentaron niveles de infección menores que el control no tratado, y no difirieron significativamente entre ellos (Figura 7). Al cabo de 9 días las células de TC92 mantuvieron su efectividad mientras que los extractos demostraron una menor efectividad. La pérdida de actividad de los extractos a lo largo del tiempo podría minimizarse mediante una adecuada formulación del extracto, por ejemplo, añadiendo compuestos adecuados para uso agrícola que favorezcan la conservación de las sustancias antimicrobianas o incrementando la concentración del extracto.

Ejemplo 7. Producción a escala industrial y preparación de formulados para alargar la vida útil de *L. plantarum* TC92.

Para la producción a escala industrial de las cepas de la invención se pueden utilizar las condiciones óptimas de fermentación que se detallan a continuación mediante bioreactor de tipo CSTR en medio líquido, aunque también se pueden utilizar técnicas basadas en

fermentación en medio sólido, todos ellos métodos estándar utilizados en la industria microbiológica.

5 Para determinar las condiciones óptimas se utilizó un fermentador Braun Biostat de 5 litros en medio MRS a 30 °C, pH 6,0, pO₂ 20% con rampa, y agitación a 100 rpm. Se inoculó un cultivo exponencial de la cepa *L. plantarum* TC92 al 1% y se monitorizaron los parámetros operacionales del bioreactor, finalizando el crecimiento en fase estacionaria a las 12 h, consiguiendo concentraciones celulares de entre 5-8 x 10⁹ UFC/ml. A continuación se centrifugó el cultivo en continuo a 8000 rpm y 10 l/h y se recogieron las células asépticamente mediante una centrífuga SA-1 Westfalia- Separator. Al final de esta etapa la biomasa se concentró unas 10-12 veces, resuspendiéndose en tampón fosfato, obteniéndose alrededor de 0,5 litros de concentrado 4-8 x 10¹⁰ UFC/ml. Posteriormente al concentrado se le añadió un ingrediente osmoprotector inerte (lactosa 15%) y se deshidrató en un Liofilizador Virtis en condiciones estándar durante 36 h, obteniéndose unos 40-50 g de peso seco (15% materia activa), con una actividad de 2-4x10¹¹ UFC/g p.s. En dichas condiciones se obtiene un producto con una viabilidad de las células cercana al 100 %, estable y fácil de almacenar y manejar, que a las dosis operativas de 10⁸ UFC/ml permite preparar unos 100 litros de producto listo para ser aplicado en las plantas de cultivo a proteger. Posteriormente se envasó el material en bolsas herméticas al vacío, que 20 conservadas a 4 °C mantienen durante más de un año su vida útil.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Lactobacillus plantarum* TC92 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 8297, o un mutante de la misma, donde
5 dicho mutante se obtiene utilizando la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92 como producto de partida y además tiene las siguientes propiedades del *Lactobacillus plantarum* TC92:
 - (i) actividad antagonista frente a *Erwinia amylovora*,
 - (ii) presencia de los genes *pln A*, *pln B*, *pln C*, *pln D*, *pln J*, *pln K*, *pln M*, *plnN*, *pln O*, *pln P*, *pln EF* y *pln I* relacionados con la síntesis de plantaricinas,
 - 10 (iii) capacidad de colonizar o sobrevivir en la flor, hojas y frutos de las plantas pertenecientes a la familia Rosaceae, y
 - (iv) capacidad de inhibir infecciones por *E. amylovora* en flores, frutos y hojas de plantas de la familia Rosaceae.
2. Uso de la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92 o de un mutante de la misma según se
15 definen en la reivindicación 1, como plaguicida en plantas.
3. Uso según la reivindicación 2, para el control del fuego bacteriano en plantas de la familia Rosaceae.
4. Uso según la reivindicación 3 donde las plantas de la familia Rosaceae se seleccionan del grupo que consiste en plantas frutales y plantas ornamentales.
- 20 5. Uso según la reivindicación 4 donde las plantas se seleccionan del grupo que consiste en peral, manzano, membrillero, níspero, espino de fuego, serbal, mostajo, acerolo, guillomo, espino albar y durillo.
6. Procedimiento de obtención de células de una cepa *Lactobacillus plantarum* TC92 o de un mutante de la misma, según se definen en la reivindicación 1, que comprende:
 - 25 (i) inocular la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92, o un mutante de la misma, en un medio de cultivo seleccionado del grupo que consiste en medios sintéticos, medios de origen vegetal, medios de origen animal, y combinaciones de los mismos
 - (ii) someter el medio de cultivo inoculado de la etapa (i) a una temperatura
30 entre 25 y 35 °C, un pH entre 5 y 7, y una concentración de oxígeno entre 15 y 30%, hasta alcanzar una concentración celular superior a 1×10^9 UFC/ml,
 - (iii) separar las células de *Lactobacillus plantarum* TC92 o del mutante de la misma del medio de cultivo, y

- (iv) recoger las células de *Lactobacillus plantarum* TC92 derivadas de la etapa (iii)
7. Procedimiento según la reivindicación 6, que comprende llevar a cabo una etapa (v), después de la etapa (iv), en la que las células se someten a un proceso de deshidratación.
8. Composición que comprende la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92 o un mutante de la misma según se define en la reivindicación 1
9. Composición plaguicida que comprende la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92 según se define en la reivindicación 1 y compuestos aceptables a nivel agrícola.
10. Composición según la reivindicación 9, donde los compuestos aceptables a nivel agrícola se seleccionan del grupo que consiste en fitofortificantes, nutrientes, humectantes, compuestos que mejoran la adherencia, compuestos tamponadores, estabilizantes, antioxidantes, osmoprotectores y protectores solares.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 9-10 que comprende al menos un plaguicida adicional.
12. Composición según la reivindicación 11 donde el plaguicida adicional se selecciona del grupo que consiste en la cepa *Lactobacillus plantarum* TC54 (depositada en la CECT con el número de acceso CECT 8298), la cepa *Lactobacillus plantarum* PM411 (depositada en la CECT con el número de acceso CECT 8299), un antibiótico y un compuesto derivado del cobre.
13. Composición según la reivindicación 12 que comprende *Lactobacillus plantarum* TC54 y *Lactobacillus plantarum* PM411.
14. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 9-13 en el control del fuego bacteriano en plantas de la familia Rosaceae.
15. Extracto de una cepa de *Lactobacillus plantarum* TC92 o de un mutante de la misma, según se definen en la reivindicación 1, dicho extracto siendo obtenible mediante el procedimiento que comprende:
- (i) inocular la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92 o un mutante de la misma según se definen en la reivindicación 1, en un medio de cultivo apropiado,
- (ii) someter el medio de cultivo inoculado con la etapa (i) a una temperatura entre 25 y 35 °C, un pH entre 5 y 7, y una concentración de oxígeno entre 15 y 30%, hasta alcanzar una concentración celular superior a 1×10^9 UFC/ml,
- (iii) separar las células del medio de cultivo de la etapa (ii),

- (iv) recoger extracto libre de células, y
- (v) someter el extracto de la etapa (iv) a un proceso de concentración.

- 5 16. Extracto de *Lactobacillus plantarum* TC92 o de un mutante de la misma, según la reivindicación 15, donde el proceso de concentración de la etapa (v) se lleva a cabo mediante deshidratación, filtración, ultrafiltración, centrifugación, precipitación o cromatografía.
17. Composición que comprende el extracto de *Lactobacillus plantarum* TC92 o de un mutante de la misma, según las reivindicaciones 15-16.
- 10 18. Composición plaguicida que comprende el extracto de *Lactobacillus plantarum* TC92 o de un mutante de la misma, según las reivindicaciones 15-16, y compuestos aceptables a nivel agrícola.
19. Uso de una composición plaguicida según se define en la reivindicación 18 en el control del fuego bacteriano en plantas de la familia Rosaceae.
- 15 20. Método de control biológico del fuego bacteriano en plantas de la familia Rosaceae que comprende el tratamiento de las plantas con la cepa *Lactobacillus plantarum* TC92 o un mutante de la misma según la reivindicación 1, el extracto según las reivindicaciones 15-16, la composición según las reivindicaciones 9-13 y/o la composición según la reivindicación 18.

20

FIG. 1

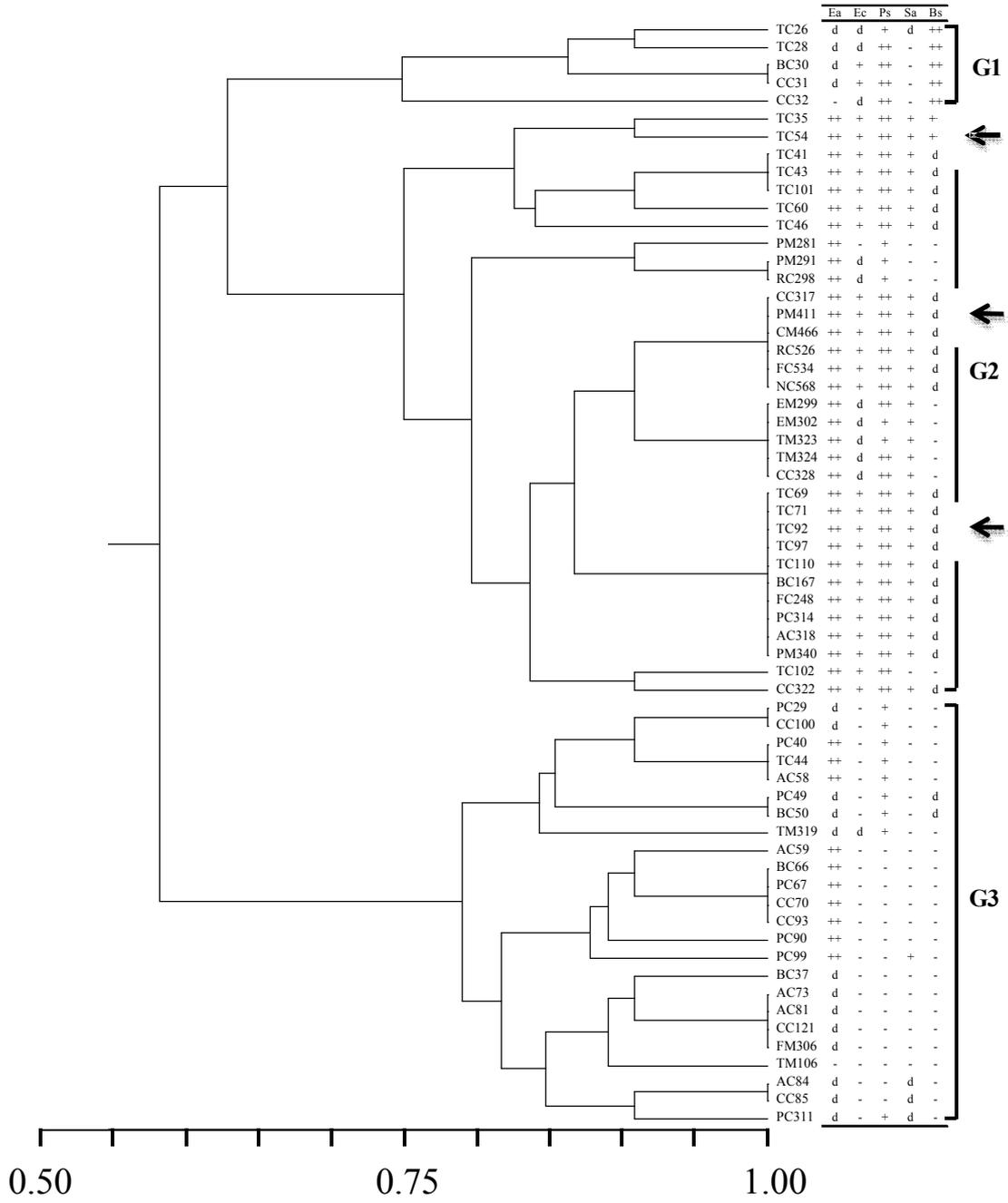


FIG. 2

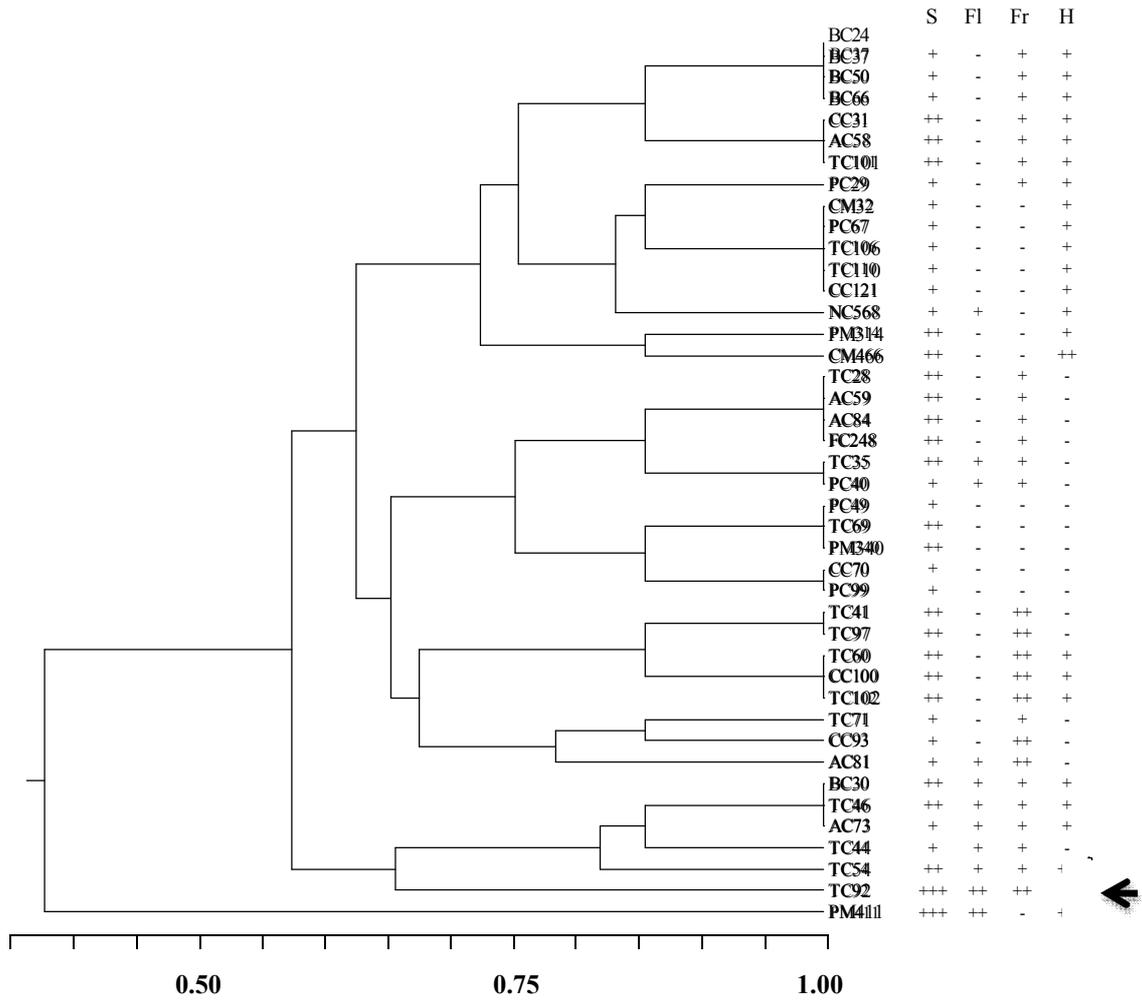


FIG. 3

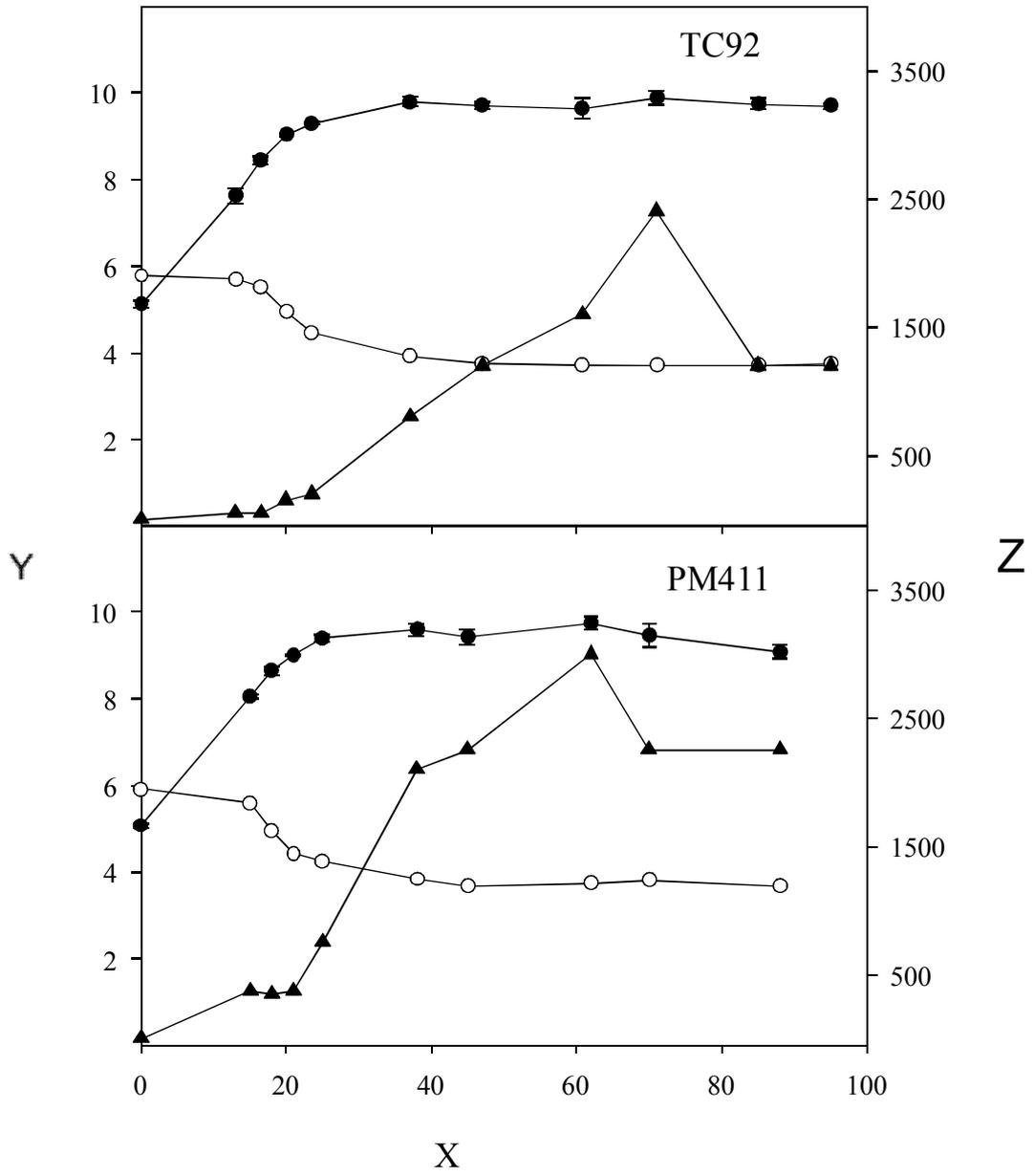


FIG. 4

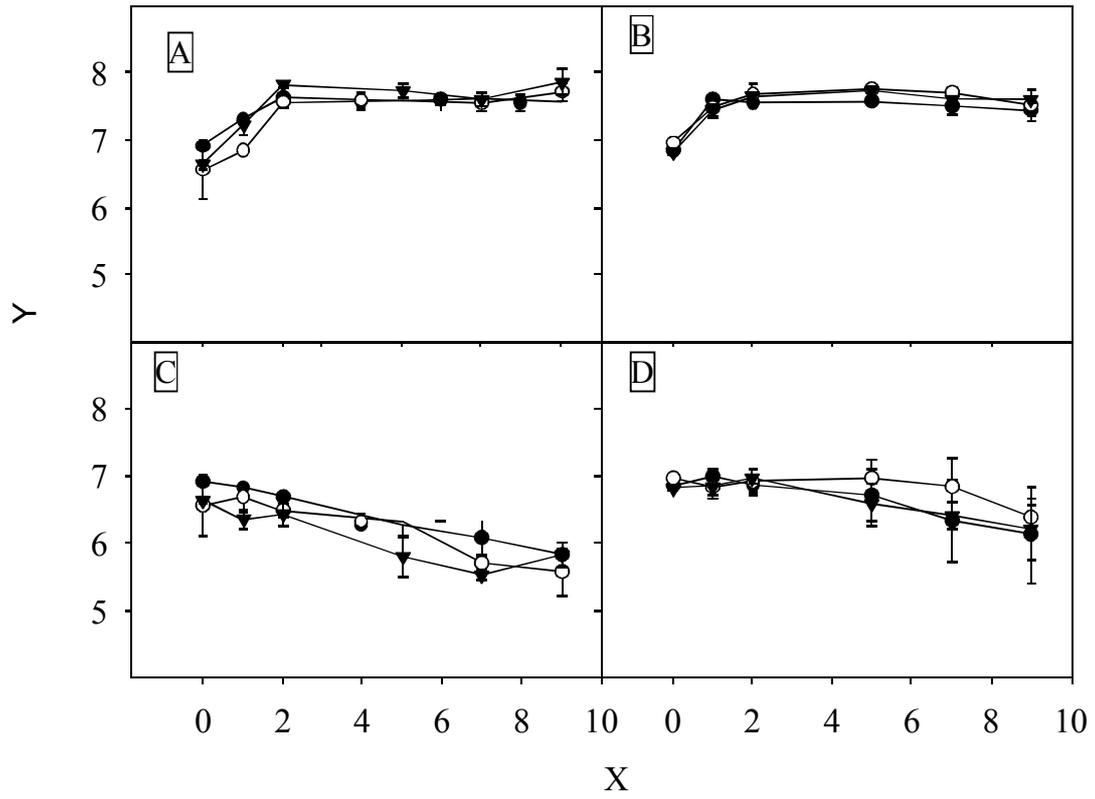


FIG. 5

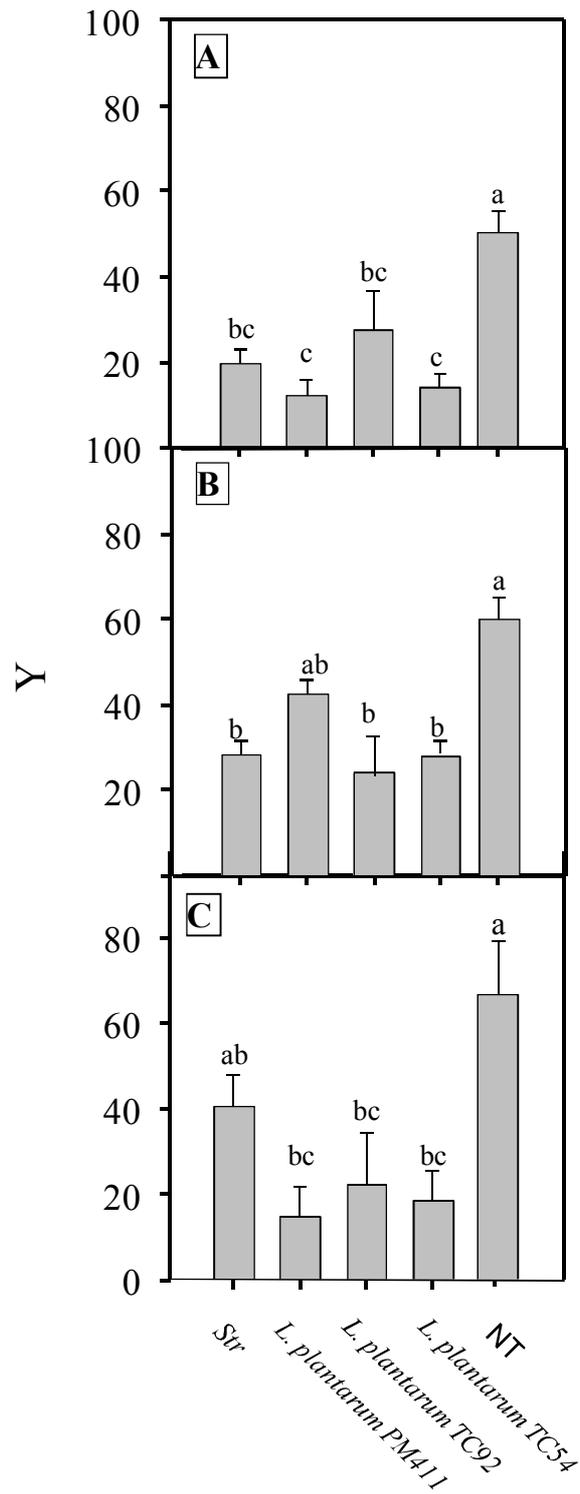


FIG. 6

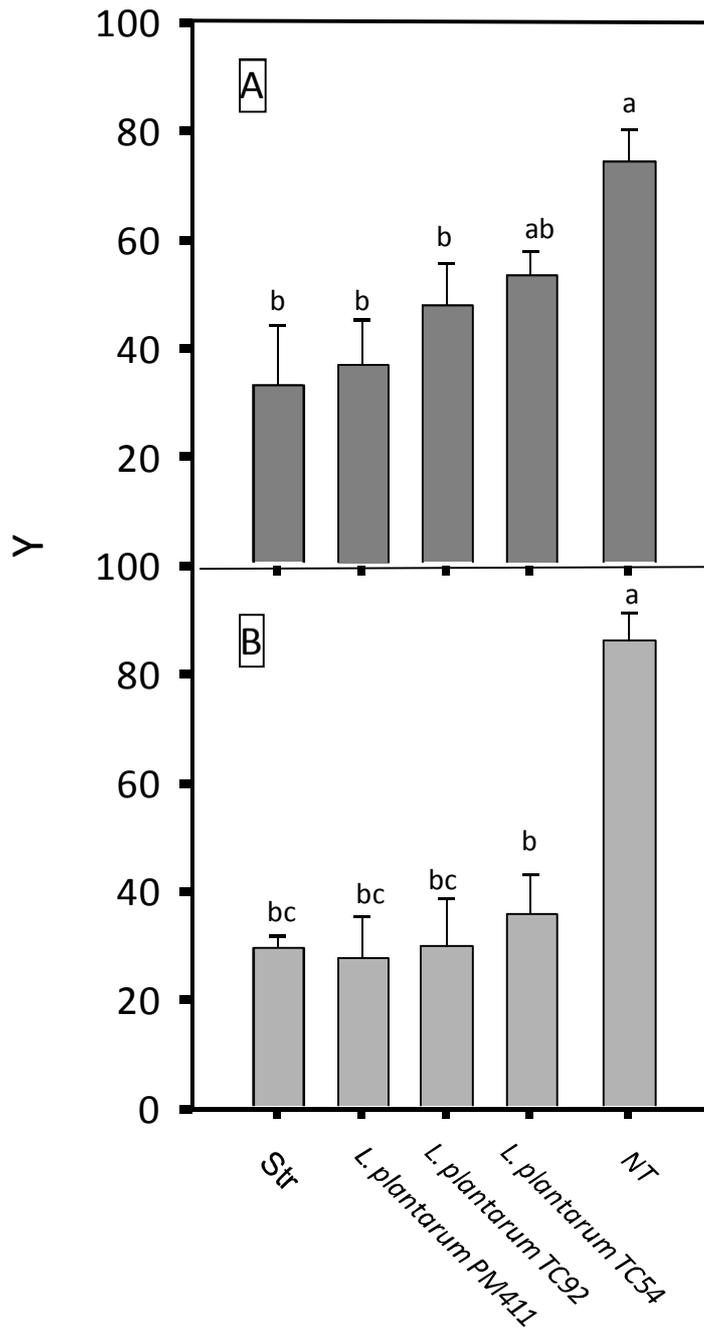


FIG. 7

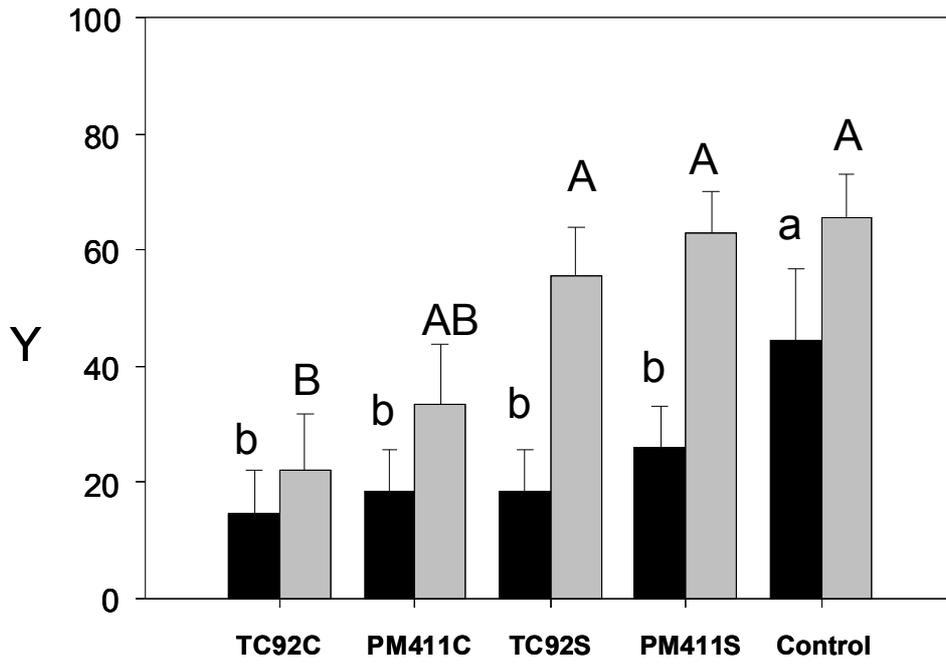
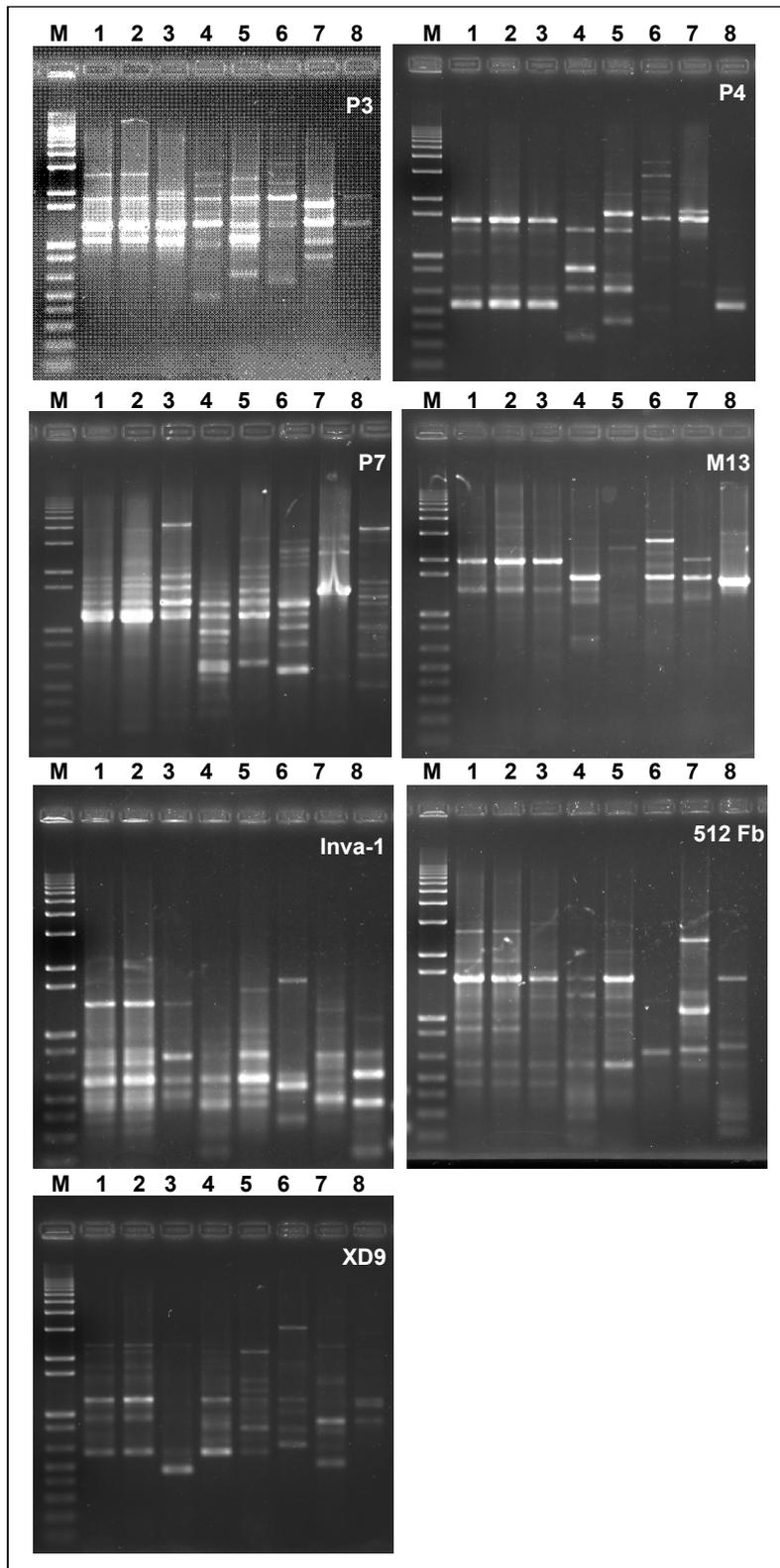


FIG. 8



ES 2 522 716 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universitat de Girona

<120> Cepa de Lactobacillus plantarum para el control del fuego bacteriano

<130> P2598ES00

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador 27f

<400> 1
agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 2
<211> 15
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador 1492r

<400> 2
accttgttac gactt 15

<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador plnA f

<400> 3
agcaacttag taataaggaa atgcaaa 27

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador plnA r

<400> 4
acagtttctt tacctgttta attgcag 27

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador plnB f

ES 2 522 716 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<400> 5 gcttcttatt taagtagagg atttctg	27
<210> 6 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> cebador p1nB r	
<400> 6 gccacgatta ctacccttag	20
<210> 7 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> cebador p1nC f	
<400> 7 agcagatgaa attcggcag	19
<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> cebador p1nC r	
<400> 8 ataatccaac ggtgcaatcc	20
<210> 9 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> cebador p1nD f	
<400> 9 tgaggacaaa cagactggac	20
<210> 10 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> cebador p1nD r	
<400> 10 gcatcggaaa aattgcggat ac	22
<210> 11 <211> 18 <212> DNA <213> Secuencia artificial	

ES 2 522 716 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<220>
 <223> cebador p1nJ f
 <400> 11
 taacgacgga ttgctctg 18

<210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador p1nJ r
 <400> 12
 aatcaaggaa ttatcacatt agtc 24

<210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador p1nK f
 <400> 13
 ctgtaagcat tgctaaccaa tc 22

<210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador p1nK r
 <400> 14
 actgctgacg ctgaaaag 18

<210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador p1nM f
 <400> 15
 aagcggata ttaaaagcgt agag 24

<210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador p1nM r
 <400> 16
 catttctcc ttaaagcatt caac 24

<210> 17
 <211> 19

ES 2 522 716 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador p1nN f

 <400> 17
 attgccgggt taggtatcg 19

 <210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador p1nN r

 <400> 18
 cctaaaccat gccatgcac 19

 <210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador p1nO f

 <400> 19
 tggattaaca aagggagaat atgc 24

 <210> 20
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador p1nO r

 <400> 20
 tcggaccct ctgattcac 19

 <210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador p1nP f

 <400> 21
 aaagtatgga caaatgacag tgg 23

 <210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador p1nP r

 <400> 22
 aatataaagt tccccaaagc agac 24

ES 2 522 716 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<210> 23
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador pInI f

 <400> 23
 gatactcaat aacttccaat gcttag 26

 <210> 24
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador pInI r

 <400> 24
 ttgtagcgat aactgaagaa tacg 24

 <210> 25
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador pInEF f

 <400> 25
 ggcatagtta aaattccccc c 21

 <210> 26
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador pInEF r

 <400> 26
 caggttgccg caaaaaaag 19

 <210> 27
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador P3

 <400> 27
 ctgctgggac 10

 <210> 28
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador P4

ES 2 522 716 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<400> 28 ccgcagcgtt	10
<210> 29 <211> 10 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> cebador P7	
<400> 29 agcagcgtgg	10
<210> 30 <211> 15 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> cebador M13	
<400> 30 gagggtggcg gttct	15
<210> 31 <211> 26 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> cebador Inv-A	
<400> 31 gtgaaattat cgccacgttc gggcaa	26
<210> 32 <211> 26 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> cebador 512Fb	
<400> 32 gtgaaattat cgccacgttc gggcaa	26
<210> 33 <211> 10 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> cebador XD9	
<400> 33 gaagtcgtcc	10



②① N.º solicitud: 201330685

②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.05.2013

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	VAN DER ZWET, T. y WALTER, J. Antagonism of lactic acid bacteria against Erwinia amylovora. Phytopathology. 1990. ANNUAL MEETING OF THE POTOMAC DIVISION OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, Mar. 21-23, 1990. Vol. 80(7), pág. 673. ISSN0031-949X.	1-20
A	US 2009169530 A1 (TSUDA, K.) 02.07.2009, todo el documento.	1-20
A	TRIAS, R. et al. Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. 2008. INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, 20071204. Vol. 123(1-2), págs. 50-60. ISSN 0168-1605.	1-20
A	HOLT, J.G., SNEATH, P. H., KRIEG, N.R. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 2), 4ª Ed. Williams & Wilkings. Baltimore. Agosto 1986. ISBN-10: 0683078933. Sección 14, páginas 1215-1216 y 1229.	6,7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.04.2014

Examinador
M. Á. Martín-Falquina Garre

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/20 (2006.01)

A01N63/00 (2006.01)

C12R1/25 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12R, A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, AGRICOLA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.04.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	VAN DER ZWET, T. y WALTER, J. Antagonism of lactic acid bacteria against <i>Erwinia amylovora</i> . <i>Phytopathology</i> . 1990. ANNUAL MEETING OF THE POTOMAC DIVISION OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, Mar. 21-23, 1990. Vol. 80(7), pág. 673. ISSN0031-949X.	03.1990
D02	US 2009169530 A1 (TSUDA, K.)	02.07.2009
D03	TRIAS, R. et al. Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. 2008. INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, 20071204. Vol. 123(1-2), págs. 50-60. ISSN 0168-1605.	04.12.2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus plantarum* TC92, a su uso para el control del fuego bacteriano producido por *Erwinia amylovora* en frutales, a su procedimiento de obtención, a composiciones que la contienen, a sus extractos y a un método de control biológico del fuego bacteriano en rosáceas utilizando dicha cepa o un extracto de la misma.

D01 divulga cepas de bacterias acidolácticas (*L.plantarum* entre otras) que muestran actividad antagonista frente a *E.amylovora* tanto in vitro como in vivo

D02 se refiere a un agente para el control biológico de enfermedades de plantas que contiene bacterias acidolácticas (*L.plantarum*, entre otras). Menciona numerosas enfermedades que afectan a las rosáceas y concretamente se refiere a enfermedades causadas por microorganismos del género *Erwinia*

D03 analiza la actividad antimicrobiana de *L. plantarum* frente a diversos patógenos que contaminan los alimentos

Reivindicación 1

Ninguno de los documentos del estado de la técnica D01-D03 divulga una cepa de *L.plantarum* TC92 con todas y cada una de las características técnicas definidas por la reivindicación 1. Por lo tanto dicha reivindicación cumple el requisito de novedad del Art. 6 LP.

D01 se considera el documento del estado de la técnica más cercano a la invención según la reivindicación 1 porque describe la actividad antagonista de cepas de *L.plantarum* frente a *E. amylovora*. Sin embargo, no divulga ninguna cepa en concreto, ni describe la combinación de genes relacionados con la síntesis de plantaricinas de la cepa de la invención. Además en D01 el efecto antagonista in vitro sólo se comprueba en hojas, mientras que la cepa de la invención es activa en hojas, flores y frutos.

Por lo tanto, la invención proporciona una cepa alternativa de *L.plantarum* que presenta propiedades mejoradas. Estas propiedades son las que se detallan en la reivindicación 1.

Como ninguno de los documentos del estado de la técnica D01-D03 considerados aisladamente o en combinación contiene indicación alguna que conduzca al experto en la materia a la cepa de la reivindicación 1 partiendo de las cepas del estado de la técnica más cercano (D01), dicha reivindicación 1 cumple con el requisito de actividad inventiva del Art. 8 LP.

Reivindicaciones 2-14

Las reivindicaciones 2-14 relativas al uso de la cepa de la invención como plaguicida, al procedimiento de aislamiento de células de dicha cepa y a una composición plaguicida que las contiene, en tanto que dependen directa o indirectamente de la reivindicación 1, cumplen con los requisitos de novedad y actividad inventiva de los Arts. 6 y 8 LP.

Reivindicaciones 15, 16, 17-19 y 20

El extracto libre de células de las reivindicaciones 15 y 16 no está descrito en ninguno de los documentos D01-D03 ni su actividad antagonista frente a *E. amylovora* (ver ejemplos 2 y 6 y figuras 3 y 7) es obvia para un experto en la materia en vista de ninguno de D01-D03 considerado aisladamente o en combinación. Por lo tanto las reivindicaciones 15 y 16 se consideran nuevas e inventivas según los Arts. 6 y 8 LP. Las reivindicaciones 17-19 en tanto que se refieren a una composición plaguicida que comprende el extracto nuevo e inventivo y a su uso para el control del fuego bacteriano, también cumplen con los requisitos de novedad y actividad inventiva de los Arts. 6 y 8 LP.

Siguiendo el mismo razonamiento, la reivindicación 20 sobre un método de control biológico del fuego bacteriano en rosáceas utilizando las cepas, extractos o composiciones anteriormente mencionadas, cumple igualmente con los requisitos de novedad y actividad inventiva de los Arts. 6 y 8 LP.